

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT**

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 01 AVR. 2004

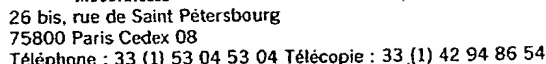
Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

THIS PAGE BLANK (USPTO)



cerfa
N° 11354*01

R1

DB 540 W / 300301

Remplir impérativement la 2^{ème} page

INPI
Réserve à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE

18 JAN. 2002

LIEU

N° D'ENREGISTREMENT

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

0200654

DB 540 W / 300301

Vos références pour ce dossier :
(facultatif)

239560 MIP

6 MANDATAIRE

Nom

Prénom

Cabinet ou Société

Cabinet REGIMBEAU

N° de pouvoir permanent et/ou
de lien contractuel

Adresse

Rue

20, rue de Chazelles

Code postal et ville

75847 PARIS CEDEX 17

N° de téléphone (facultatif)

01 44 29 35 00

N° de télécopie (facultatif)

01 44 29 35 99

Adresse électronique (facultatif)

info@regimbeau.fr

7 INVENTEUR(S)

Les inventeurs sont les demandeurs

☐ Oui

☒ Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée

8 RAPPORT DE RECHERCHE

Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)

Établissement immédiat
ou établissement différé

☒

☐

Paiement échelonné de la redevance

Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques

☐ Oui

☐ Non

**9 RÉDUCTION DU TAUX
DES REDEVANCES**

Uniquement pour les personnes physiques

☐ Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition)

☐ Requête antérieurement à ce dépôt (joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence):

Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite»,
indiquez le nombre de pages jointes

**VISA DE LA PRÉFECTURE
OU DE L'INPI**

**10 SIGNATURE DU DEMANDEUR
OU DU MANDATAIRE**
(Nom et qualité du signataire)

M. BLANCANEUX

ORIGINAL

1

La présente invention est relative à de nouvelles compositions comprenant au moins un premier composé capable de se fixer spécifiquement sur le récepteur humain du facteur de croissance I apparenté à l'insuline IGF-IR et d'inhiber son activité, et un deuxième composé capable de se fixer spécifiquement sur le récepteur humain du
5 facteur de croissance de l'épiderme EGFR et d'inhiber son activité, composition dans laquelle ledit premier composé est notamment un anticorps anti-IGF-IR dont les séquences d'acide aminé et nucléiques codant pour les CDR de cet anticorps ont été ici caractérisées. L'invention comprend aussi ces compositions comme produits de
10 combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps, notamment en association avec des agents anticancéreux. L'invention comprend également l'utilisation de ces compositions à titre de médicament pour le traitement prophylactique et/ou thérapeutique de cancers ainsi que des procédés de diagnostic de maladies liées à la surexpression du récepteur IGF-IR et EGFR.

15 Les facteurs de croissance sont de petites protéines impliquées dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des cellules normales. Certains de ces facteurs de croissance jouent également un rôle important dans l'initiation et la maintenance de la transformation cellulaire, pouvant fonctionner comme facteurs autocrines ou paracrines. C'est notamment le cas du facteur de croissance de l'épiderme EGF (EGF
20 pour "Epidermal Growth Factor") et du facteur de croissance I apparenté à l'insuline IGF1 (IGF1 pour "Insuline-like Growth Factor-I") qui semblent particulièrement impliqués dans l'apparition du phénotype tumoral, la progression des tumeurs et la génération des métastases.

25 L'EGF et l'IGF1 exercent leur action par l'intermédiaire de leur récepteur respectif dénommé ici EGFR et IGF-IR. Il s'agit dans les deux cas de récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase dont la surexpression est décrite dans de nombreux cancers. Il faut cependant noter que l'interaction de ces deux récepteurs n'est
30 pas clairement établie et que les études effectuées par diverses équipes à ce propos donnent des résultats contradictoires quant à la collaboration de ces deux récepteurs. Des travaux effectués sur des cellules de tumeurs de la prostate montrent que

l'interruption de la boucle autocrine EGF/EGFR par un anticorps monoclonal (dénommé ici "ACM" ou "AcM") anti-EGFR se traduit par une perte complète de la réponse des cellules DU145 à l'IGF1 (Connolly J.M. and Rose D.P., Prostate, Apr. 24(4):167-75, 1994 ; Putz T. et al., Cancer Res., Jan. 1, 59(1):227-33, 1999). Ces résultats suggéreraient qu'un blocage du récepteur à l'EGF serait suffisant pour obtenir une inhibition totale des signaux de transformation générés par l'activation des deux récepteurs (EGFR et IGF-IR). En revanche, d'autres études (Pietrkowski et al., Cell Growth Differ, Apr., 3(4):199-205, 1992 ; Coppola et al., Mol Cell Biol., Jul., 14(7):4588-95, 1994) ont montré qu'une surexpression de l'EGFR nécessite la présence d'un IGF-IR fonctionnel pour exercer son potentiel mitogénique et transformant, alors que l'IGF-IR ne nécessite pas, pour sa part, la présence d'EGF fonctionnel pour médier son action. Cette seconde série d'études serait plus en accord avec une stratégie tendant à bloquer préférentiellement l'IGF-IR dans le but d'atteindre simultanément les deux récepteurs.

De manière surprenante, les inventeurs ont mis ainsi en évidence qu'une co-administration d'un premier composé capable d'inhiber la fixation de l'IGF1 et/ou IGF2 sur le récepteur IGF-IR et d'un deuxième composé capable d'inhiber la fixation de l'EGF sur le récepteur EGFR, notamment des ACM respectivement dirigés contre chacun de ces récepteurs, permettait d'obtenir une synergie d'action significative de ces deux composés contre la croissance tumorale *in vivo* chez des souris nude porteuses d'une tumeur. Une des hypothèses les plus probables pouvant expliquer cette synergie d'action de ces deux types de composés lorsque ceux-ci sont co-administrés est que les deux facteurs de croissance EGF et IGF1 (et/ou IGF2) agissent eux-mêmes en synergie dans la transformation de cellules normales en cellules à caractère tumoral et/ou dans la croissance et/ou la prolifération de cellules tumorales pour certaines tumeurs, notamment pour celles surexprimant les deux récepteurs EGFR et IGF-IR et/ou présentant une suractivité du signal de transduction médié par ces deux récepteurs, en particulier au niveau de l'activité tyrosine kinase de ces récepteurs.

Ainsi, la présente invention a pour objet une composition comprenant :

- un premier composé choisi parmi les composés capables de se fixer spécifiquement sur le récepteur humain du facteur de croissance I apparenté à l'insuline IGF-IR, et/ou capables d'inhiber spécifiquement l'activité tyrosine kinase dudit récepteur IGF-IR ; et

- 5 - un deuxième composé choisi parmi les composés capables de se fixer spécifiquement sur le récepteur humain du facteur de croissance de l'épiderme EGFR, et/ou capables d'inhiber spécifiquement l'activité tyrosine kinase dudit récepteur EGFR.

Dans la présente description, le terme "EGFR" désignant le récepteur de l'EGF comprend également :

- 10 - les hétérodimères fonctionnels dans lesquels l'EGFR est l'un des composants de ces hétérodimères, comme particulièrement les hétérodimères EGFR-ErbB2 impliqués dans la prolifération des cellules tumorales (Johannensen et al., Biochem. J., 356:87-96, 2001) ; et

- les formes mutantes actives de l'EGFR qui peuvent être également impliquées
15 dans les cancers, comme particulièrement le variant dénommé EGFRvIII notamment impliqué dans les cancers du sein, de l'ovaire, de la prostate, des poumons et du cerveau (Kuan et al., Brain Tumor Pathol., 17(2):71-78, 2000).

De préférence, le premier composé sera également capable d'inhiber la fixation de l'IGF1 et/ou IGF2 sur le récepteur humain IGF-IR, et ledit deuxième composé
20 capable d'inhiber la fixation de l'EGF sur le récepteur humain EGFR, notamment par inhibition compétitive.

Parmi les premiers composés capables de se fixer spécifiquement sur le récepteur IGF-IR, et/ou capables d'inhiber spécifiquement l'activité tyrosine kinase dudit récepteur IGF-IR, on peut citer d'une part :

- 25 - les anticorps anti-IGF-IR, ou leurs fragments fonctionnels, tels que l'anticorps monoclonal murin 7C10 et ses dérivés chimériques ou humanisés, tels que décrits ci-après, l'anticorps monoclonal murin α IR3 (Kull et al., J. Biol. Chem., 258:6561-6566, 1983), l'anticorps monoclonal murin 1H7 (Li et al., Bioch. Biophys. Res. Com., 196(1):92-98, 1993), ou le scFv-Fc 1H7 (Li et al., Cancer Immunol. Immunother.,
30 49:243-252, 2000), ou tout autre anticorps se fixant sur l'IGF-IR et inhibant son activité ; et, d'autre part,

- les inhibiteurs compétitifs de l'IGF1 et/ou IGF2, autres que les anticorps anti-IGF-IR, tels que le récepteur soluble IGF-IR, ou son fragment extramembranaire, ou certains IGF-BP (pour IGF-Binding Protein),

- ou tout inhibiteur spécifique de l'activité tyrosine kinase du récepteur IGF-IR.

5 Dans un mode de réalisation préféré, la composition selon la présente invention est caractérisée en ce que ledit premier composé est un anticorps anti-IGF-IR isolé, ou l'un de ses fragments fonctionnels, ledit anticorps ou l'un de sesdits fragments étant capable de se fixer récepteur IGF-IR humain et, le cas échéant, de préférence capable en outre d'inhiber la fixation naturelle des ligands IGF1 et/ou IGF2 de IGF-IR, notamment
10 par inhibition compétitive.

Comme cela a été indiqué précédemment, l'IGF-IR est exprimé dans une grande variété de tumeurs et de lignées tumorales et les IGFs amplifient la croissance tumorale via leur fixation à l'IGF-IR. Un certain nombre d'études ont été réalisées en utilisant des anticorps monoclonaux murins dirigés contre le récepteur IGF-IR ou des dominants
15 négatifs de l'IGF-IR afin d'argumenter en faveur du rôle de IGF-IR dans la cancérogenèse. Ces études ont pu mettre en évidence que des anticorps monoclonaux murins dirigés contre l'IGF-IR inhibent la prolifération de nombreuses lignées cellulaires en culture et la croissance de cellules tumorales *in vivo* (Arteaga C. et al., Cancer Res., 49:6237-6241, 1989 ; Li et al., Biochem. Biophys. Res. Com., 196:92-98,
20 1993 ; Zia F. et al., J. Cell. Biol., 24:269-275, 1996 ; Scotlandi K. et al., Cancer Res., 58:4127-4131, 1998). Il a également été montré dans les travaux de Jiang et al. (Oncogene, 18:6071-6077, 1999) qu'un dominant négatif de l'IGF-IR est capable d'inhiber la prolifération tumorale.

Les anticorps monoclonaux murins cités dans les documents ci-avant, tels que
25 l'anticorps α IR3 ou l'anticorps 1H7, font partie des anticorps anti-IGF-IR qui peuvent être choisis comme premier composé pour les compositions selon la présente invention, ainsi que leurs dérivés chimériques ou humanisés, ou encore leurs fragments fonctionnels comme définis ci-après.

L'invention a en outre pour objet une composition selon l'invention, caractérisée
30 en ce que ledit anticorps est choisi parmi les anticorps monoclonaux, chimériques ou humanisés anti-IGF-IR et en ce que leurs dits fragments fonctionnels sont choisis parmi

les fragments Fv, Fab, (Fab')₂, Fab', scFv, scFv-Fc et les diabodies, ou encore tout fragment fonctionnel de ces anticorps dont la demie-vie aurait été augmentée par une modification chimique, comme l'ajout de poly(alkylène) glycol tel que le poly(éthylène) glycol (PEG), ou encore par incorporation dans un liposome.

5 Les anticorps entrant dans les compositions (ou produit de combinaison) selon la présente invention, qu'ils s'agissent des anticorps anti-IGF-1 ou anti-EGF sont de préférence des anticorps monoclonaux spécifiques, notamment d'origine murine, chimériques ou humanisés qui pourront être obtenus selon les méthodes standards bien connues de l'homme de l'art.

10 En général, pour la préparation d'anticorps monoclonaux ou leurs fragments fonctionnels, notamment d'origine murine, on pourra se référer aux techniques qui sont en particulier décrites dans le manuel « Antibodies » (Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY, pp. 726, 1988) ou à la technique de préparation à partir d'hybridomes décrite par Köhler et
15 Milstein (Nature, 256:495-497, 1975).

Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus par exemple à partir de cellule d'un animal immunisé contre le récepteur IGF-IR ou contre le récepteur EGFR, ou un de leurs fragments comportant l'épitope reconnu spécifiquement par lesdits anticorps monoclonaux. Ledit récepteur IGF-IR ou EGFR, ou un de leurs dits fragments, pourra
20 notamment être produit selon les modes opératoires usuels, par recombinaison génétique à partir d'une séquence d'acide nucléique contenue dans la séquence de l'ADNc codant pour le récepteur IGF-IR ou EGFR, ou par synthèse peptidique à partir d'une séquence d'acides aminés comprise dans la séquence peptidique du récepteur IGF-IR ou EGFR.

Les anticorps monoclonaux pourront par exemple être purifiés sur une colonne d'affinité sur laquelle a préalablement été immobilisée le récepteur IGF-IR ou EGFR, ou
25 un de leurs fragments comportant l'épitope reconnu spécifiquement par lesdits anticorps monoclonaux.

Sont également compris par anticorps selon la présente invention, les anticorps chimériques ou humanisés.

30 Par anticorps chimérique, on entend désigner un anticorps qui contient une région variable (chaîne légère et chaîne lourde) naturelle dérivée d'un anticorps d'une

espèce donnée en association avec les régions constantes de chaîne légère et chaîne lourde d'un anticorps d'une espèce hétérologue à ladite espèce donnée.

Les anticorps de type chimérique, ou leurs fragments fonctionnels, entrant dans les compositions selon l'invention peuvent être préparés en utilisant les techniques de recombinaison génétique. Par exemple, l'anticorps chimérique pourra être réalisé en
5 clonant un ADN recombinant comportant un promoteur et une séquence codant pour la région variable d'un anticorps monoclonal non humain, notamment murin, selon l'invention et une séquence codant pour la région constante d'anticorps humain. Un anticorps chimérique de l'invention codé par un tel gène recombinant sera par exemple
10 une chimère souris-homme, la spécificité de cet anticorps étant déterminée par la région variable dérivée de l'ADN murin et son isotype déterminé par la région constante dérivée de l'ADN humain. Pour les méthodes de préparation d'anticorps chimériques, on pourra par exemple se référer au document Verhoeven et al. (BioEssays, 8:74, 1988).

Par anticorps humanisés, on entend désigner un anticorps qui contient des
15 régions CDRs dérivées d'un anticorps d'origine non humaine, les autres parties de la molécule d'anticorps étant dérivées d'un (ou de plusieurs) anticorps humain. En outre, certains des résidus des segments du squelette (dénommés FR) peuvent être modifiés pour conserver l'affinité de liaison (Jones et al., Nature, 321:522-525, 1986 ; Verhoeven et al., Science, 239:1534-1536, 1988 ; Riechmann et al., Nature, 332:323-327, 1988.)

20 Les anticorps humanisés, ou leurs fragments fonctionnels, entrant dans les compositions selon l'invention peuvent être préparés par des techniques connues de l'homme de l'art (comme par exemple celles décrites dans les documents Singer et al., J. Immun. 150:2844-2857, 1992 ; Mountain et al., Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10:1-142, 1992 ; ou Bebbington et al., Bio/Technology, 10:169-175, 1992). De tels anticorps
25 humanisés selon l'invention sont préférés pour leur utilisation dans des méthodes de diagnostic *in vitro*, ou de traitement prophylactique et/ou thérapeutique *in vivo*.

Par fragment fonctionnel d'un anticorps anti-IGF-IR ou anti-EGFR selon l'invention, on entend désigner en particulier un fragment d'anticorps, tel que des fragments Fv, scFv (sc pour simple chaîne), Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc ou diabodies,
30 capable d'exercer de manière générale une activité même partielle de l'anticorps dont il est issu, telle qu'en particulier la capacité à reconnaître et à se fixer sur le récepteur IGF-

IR pour un fragment fonctionnel d'un anticorps anti-IGF-IR ou la capacité à reconnaître et à se fixer sur le récepteur EGFR pour un fragment fonctionnel d'un anticorps anti-EGFR.

De préférence, lesdits fragments fonctionnels seront constitués ou comprendront une séquence partielle de la chaîne variable lourde ou légère de l'anticorps dont ils sont dérivés, ladite séquence partielle étant suffisante pour retenir la même spécificité de liaison que l'anticorps dont elle est issue et une affinité suffisante, de préférence au moins égale à 1/100, de manière plus préférée à au moins 1/10 ou 1/5 de celle de l'anticorps dont elle est issue, vis-à-vis du récepteur IGF-IR ou EGFR suivant le cas.

Un tel fragment fonctionnel comportera au minimum 5 acides aminés, de préférence 10, 15, 25, 50 et 100 acides aminés consécutifs de la séquence de l'anticorps dont il est issu.

De préférence, ces fragments fonctionnels seront des fragments de type Fv, scFv, Fab, F(ab')₂, Fab', scFv-Fc ou diabodies, qui possèdent généralement la même spécificité de fixation que l'anticorps monoclonal, chimérique ou humanisé dont ils sont issus. Selon la présente invention, des fragments d'anticorps de l'invention peuvent être obtenus à partir des anticorps monoclonaux, chimériques ou humanisés tels que décrits précédemment par des méthodes telles que la digestion par des enzymes, comme la pepsine ou la papaïne et/ou par clivage des ponts disulfures par réduction chimique. D'une autre manière, les fragments d'anticorps monoclonaux, chimériques ou humanisés compris dans la présente invention peuvent être obtenus par des techniques de recombinaisons génétiques bien connues également de l'homme de l'art ou encore par synthèse peptidique au moyen par exemple de synthétiseurs automatiques de peptides tels que ceux fournis par la société Applied Biosystems, etc..

De manière plus préférée, les anticorps monoclonaux, chimériques ou humanisés, ou leurs fragments fonctionnels selon la présente invention, sont obtenus par recombinaison génétique ou par synthèse chimique.

Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, la composition selon la présente invention est caractérisée en ce que ledit premier composé ne se fixe pas de manière significative au récepteur humain IR de l'insuline (IR pour « Insuline Recepteur »).

En effet, le récepteur IGF-IR, qui est une glycoprotéine de poids moléculaire d'environ 350 000 comporte 70 % d'homologie avec le récepteur à l'insuline IR. L'IGF-IR est un récepteur hétérotétramérique dont chaque moitié -reliée par des ponts disulfures- est composée d'une sous unité α extracellulaire et d'une sous unité β transmembranaire (voir figure 1). L'IGF-IR fixe l'IGF1 et l'IGF2 avec une très forte affinité ($K_d \approx 1$ nM) mais est également capable de fixer l'insuline avec une affinité 100 à 1 000 fois moindre. Inversement, l'IR fixe l'insuline avec une très forte affinité alors que les IGFs ne se fixent au récepteur à l'insuline qu'avec une affinité 100 fois inférieure. Le domaine tyrosine kinase de l'IGF-IR et de l'IR présentent une très forte homologie de séquence alors que les zones de plus faible homologie concernent respectivement la région riche en cystéine située sur la sous unité α et la partie C-terminale de la sous unité β . Les différences de séquences observées dans la sous unité α sont situées dans la zone de fixation des ligands et sont donc à l'origine des affinités relatives de l'IGF-IR et de l'IR pour les IGFs et l'insuline respectivement. Les différences dans la partie C-terminale de la sous unité β résultent en une divergence dans les voies de signalisation des deux récepteurs ; l'IGF-IR médiant des effets mitogéniques, de différenciation et d'anti-apoptose, alors que l'activation de l'IR entraîne principalement des effets au niveau des voies métaboliques (Baserga et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1332:F105-126, 1997 ; Baserga R., *Exp. Cell. Res.*, 253:1-6, 1999).

Les protéines tyrosine-kinases cytoplasmiques sont activées par la fixation du ligand au domaine extracellulaire du récepteur. L'activation des kinases entraîne à son tour la stimulation de différents substrats intracellulaires, incluant l'IRS-1, l'IRS-2, Shc et Grb 10 (Peruzzi F. et al., *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 125:166-173, 1999). Les deux substrats majeurs de l'IGF-IR sont l'IRS-1 et Shc qui médient, par l'activation de nombreux effecteurs en aval, la plupart des effets de croissance et de différenciation liés à la fixation des IGFs à ce récepteur (figure 2). La disponibilité de substrats peut par conséquent dicter l'effet biologique final lié à l'activation de l'IGF-IR. Lorsque l'IRS-1 prédomine, les cellules tendent à proliférer et à se transformer. Lorsque Shc domine, les cellules tendent à se différencier (Valentinis B. et al., *J. Biol. Chem.*, 274:12423-12430, 1999). Il semble que la voie principalement en cause pour les effets de protection contre l'apoptose soit la voie des phosphatidylinositol 3-kinases (PI 3-kinases) (Prisco M. et al.,

Horm. Metab. Res., 31:80-89, 1999 ; Peruzzi F. et al., J. Cancer Res. Clin. Oncol., 125:166-173, 1999).

Ainsi, dans la présente invention, il serait préférable de pouvoir disposer dans les compositions (ou produits de combinaisons) de l'invention d'un premier composé, notamment un anticorps anti-IGF-IR, qui reconnaîtra spécifiquement et, le cas échéant, avec une forte affinité l'IGF-IR, et qui en outre n'interagira pas ou peu avec le récepteur IR à l'insuline. De préférence encore, ce premier composé, notamment un anticorps anti-IGF-IR, devra par sa fixation sur l'IGF-IR inhiber *in vitro* la croissance des tumeurs exprimant l'IGF-IR en interagissant principalement avec les voies de transduction du signal activées lors des interactions IGF1/IGF-IR et/ou IGF2/IGF-IR. De manière encore plus préférée, ce premier composé, notamment un anticorps anti-IGF-IR, devra être actif *in vivo* sur tout les types de tumeurs exprimant l'IGF-IR, et, le cas échéant, susceptible d'exprimer EGFR, y compris les tumeurs du sein estrogène dépendantes et les tumeurs de la prostate, ce qui n'est pas le cas pour les anticorps monoclonaux anti-IGF-IR actuellement disponibles comme l' α IR3. En effet l' α IR3, qui fait référence dans le domaine de l'IGF-IR, inhibe totalement la croissance de tumeurs du sein estrogène dépendantes (MCF-7) *in vitro* mais est sans effet sur le modèle correspondant *in vivo* (Arteaga C. et al., J. Clin. Invest. 84:1418-1423, 1989). De même, le fragment scFv-Fc dérivé du monoclonal murin 1H7, n'est que faiblement actif sur la tumeur du sein MCF-7 et totalement inactif sur une tumeur de la prostate androgène indépendante (Li S.L. et al., Cancer Immunol. Immunother., 49:243-252, 2000).

Ainsi, et pour répondre à cette attente, les inventeurs ont mis en évidence un anticorps monoclonal murin, dénommé 7C10, chimérique (dénommé C7C10) et deux anticorps humanisés dénommés respectivement h7C10 forme humanisée 1 et h7C10 forme humanisée 2, dérivés de l'anticorps monoclonal murin 7C10, reconnaissant l'IGF-IR et répondant à tous les critères énoncés ci-dessus, c'est-à-dire à une non reconnaissance du récepteur à l'insuline, à un blocage *in vitro* de la prolifération IGF1 et/ou IGF2 induite mais également à l'inhibition *in vivo* de la croissance de différentes tumeurs exprimant l'IGF-IR parmi lesquelles un ostéosarcome et une tumeur du poumon non à petites cellules mais également et plus particulièrement la tumeur du sein estrogène dépendante MCF-7 et une tumeur de la prostate. De même, et de façon

surprenante, l'intensité d'inhibition de la croissance tumorale de la cellule MCF-7 *in vivo* par l'anticorps 7C10 est comparable, voire significativement supérieure, à celle observée avec le tamoxifen, l'un des composés de référence dans le traitement des tumeurs du sein estrogènes dépendantes. Ces anticorps ont pu être caractérisés par leur séquence peptidique et nucléique, notamment par la séquence de leurs régions déterminant leur complémentarité (CDR) pour l'IGF-IR.

C'est pourquoi, dans un mode de réalisation particulièrement préféré, l'invention a pour objet une composition selon l'invention, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR isolé, ou l'un de ses fragments fonctionnels, capable de se fixer spécifiquement au récepteur humain IGF-IR et, le cas échéant, de préférence capable en outre d'inhiber la fixation naturelle des ligands IGF1 et/ou IGF2 de IGF-IR, comprend une chaîne légère comprenant au moins une région CDR déterminant la complémentarité choisie parmi les CDRs de séquence d'acide aminé SEQ ID Nos. 2, 4 ou 6, ou au moins un CDR dont la séquence présente au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID Nos. 2, 4 ou 6, ou en ce qu'il comprend une chaîne lourde comprenant au moins un CDR choisie parmi les CDRs de séquence d'acide aminé SEQ ID Nos. 8, 10 et 12, ou au moins un CDR dont la séquence présente au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 8, 10 et 12.

Dans la présente description, les termes polypeptides, séquences polypeptidiques, peptides et protéines attachés aux composés anticorps ou à leur séquence sont interchangeables.

Il doit être compris ici que l'invention ne concerne pas les compositions dans lesquelles les anticorps sont sous une forme naturelle, c'est-à-dire qu'ils ne sont pas pris dans leur environnement naturel mais qu'ils ont pu être isolés ou obtenus par purification à partir de sources naturelles, ou bien obtenus par recombinaison génétique, ou par synthèse chimique, et qu'ils peuvent alors comporter des acides aminés non naturels comme cela sera décrit plus loin.

Par région CDR ou CDR, on entend désigner les régions hypervariables des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines comme définies par Kabat et al.

(Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH, 1991, and later editions). Il existe 3 CDRs de chaîne lourde et 3 CDRs de chaîne légère. Le terme CDR ou CDRs est utilisé ici pour désigner suivant les cas, l'une de ces régions ou plusieurs, voire l'ensemble, de ces régions qui contiennent la majorité des résidus d'acides aminés responsables de la liaison par affinité de l'anticorps pour l'antigène ou l'épitope qu'il reconnaît.

Par « pourcentage d'identité » entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acide aminé au sens de la présente invention, on entend désigner un pourcentage de nucléotides ou de résidus d'acides aminés identiques entre les deux séquences à comparer, obtenu après le meilleur alignement (alignement optimal), ce pourcentage étant purement statistique et les différences entre les deux séquences étant réparties au hasard et sur toute leur longueur. Les comparaisons de séquences entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acide aminé sont traditionnellement réalisées en comparant ces séquences après les avoir alignées de manière optimale, ladite comparaison pouvant être réalisée par segment ou par « fenêtre de comparaison ». L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé, outre manuellement, au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Smith et Waterman (1981) [Ad. App. Math. 2:482], au moyen de l'algorithme d'homologie locale de Neddleman et Wunsch (1970) [J. Mol. Biol. 48:443], au moyen de la méthode de recherche de similarité de Pearson et Lipman (1988) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444], au moyen de logiciels informatiques utilisant ces algorithmes (GAP, BESTFIT, FASTA et TFASTA dans le Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI, ou encore par les logiciels de comparaison BLAST N ou BLAST P).

Le pourcentage d'identité entre deux séquences d'acide nucléique ou d'acide aminé est déterminé en comparant ces deux séquences alignées de manière optimale dans laquelle la séquence d'acide nucléique ou d'acide aminé à comparer peut comprendre des additions ou des délétions par rapport à la séquence de référence pour un alignement optimal entre ces deux séquences. Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions identiques pour lesquelles le nucléotide ou le résidu d'acide aminé est identique entre les deux séquences, en divisant ce nombre de positions identiques par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison et



en multipliant le résultat obtenu par 100 pour obtenir le pourcentage d'identité entre ces deux séquences.

Par exemple, on pourra utiliser le programme BLAST, « BLAST 2 sequences » (Tatusova et al., "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) disponible sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/bl2.html>, les paramètres utilisés étant ceux donnés par défaut (en particulier pour les paramètres « open gap pénalité » : 5, et « extension gap pénalité » : 2 ; la matrice choisie étant par exemple la matrice « BLOSUM 62 » proposée par le programme), le pourcentage d'identité entre les deux séquences à comparer étant calculé directement par le programme.

Par séquence d'acide aminé présentant au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 % d'identité avec une séquences d'acide aminé de référence, on préfère celles présentant par rapport à la séquence de référence, certaines modifications, en particulier une délétion, addition ou substitution d'au moins un acide aminé, une troncation ou un allongement. Dans le cas d'une substitution, d'un ou plusieurs acide(s) aminé(s) consécutif(s) ou non consécutif(s), on préfère les substitutions dans lesquelles les acides aminés substitués sont remplacés par des acides aminés « équivalents ». L'expression « acides aminés équivalents » vise ici à désigner tout acide aminé susceptible d'être substitué à l'un des acides aminés de la structure de base sans cependant modifier essentiellement les activités biologiques des anticorps correspondants et telles qu'elles seront définies par la suite, notamment dans les exemples.

Ces acides aminés équivalents peuvent être déterminés soit en s'appuyant sur leur homologie de structure avec les acides aminés auxquels ils se substituent, soit sur des résultats d'essais comparatifs d'activité biologique entre les différents anticorps susceptibles d'être effectués.

A titre d'exemple, on mentionne les possibilités de substitution susceptibles d'être effectuées sans qu'il résulte en une modification approfondie de l'activité biologique de l'anticorps modifié correspondant. On peut remplacer ainsi la leucine par la valine ou l'isoleucine, l'acide aspartique par l'acide glutamique, la glutamine par

l'asparagine, l'arginine par la lysine, etc., les substitutions inverses étant naturellement envisageables dans les mêmes conditions.

Dans un mode de réalisation encore préféré, l'invention a pour objet une composition selon l'invention, caractérisée en ce que l'anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de ses fragments fonctionnels, comprend une chaîne lourde comprenant au moins un CDR de séquence SEQ ID No. 12 ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 12.

Parmi les six courtes séquences de CDR, le troisième CDR de la chaîne lourde (CDRH3) a une plus grande variabilité de taille (grande diversité essentiellement due aux mécanismes d'arrangement des gènes qui lui donnent naissance). Il peut être aussi court que 2 acides aminés alors que la taille la plus longue connue est de 26. Fonctionnellement, le CDRH3 joue un rôle à part dans la détermination de la spécificité de l'anticorps (Segal et al., PNAS, 71:4298-4302, 1974 ; Amit et al., Science, 233:747-753, 1986 ; Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901-917, 1987 ; Chothia et al., Nature, 342:877-883, 1989 ; Caton et al., J. Immunol., 144:1965-1968, 1990 ; Sharon et al., PNAS, 87:4814-4817, 1990 ; Sharon et al., J. Immunol., 144:4863-4869, 1990 ; Kabat et al., J. Immunol., 147:1709-1719, 1991).

Il est connu que seul un faible pourcentage des acides aminés des CDRs contribue à la construction de site de liaison de l'anticorps, mais ces résidus doivent être maintenus dans une conformation tridimensionnelle très spécifique.

Dans un mode de réalisation encore préféré, l'invention a pour objet une composition selon l'invention, caractérisée en ce que l'anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de ses fragments fonctionnels, comprend une chaîne lourde comprenant au moins deux des trois CDRs ou les trois CDRs de séquence SEQ ID Nos. 8, 10 et 12, ou au moins deux de trois CDRs ou trois CDRs de séquence présentant respectivement au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID Nos. 8, 10 et 12.

Dans un mode de réalisation encore préféré, l'invention a pour objet une composition selon l'invention, caractérisée en ce que l'anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de ses fragments fonctionnels, comprend une chaîne légère comprenant au moins un CDR choisi parmi les CDRs de séquence SEQ ID No. 2, 4 ou 6, ou un CDR dont la séquence



présente au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 2, 4 ou 6.

5 Dans un mode de réalisation encore préféré, l'invention a pour objet une composition selon l'invention, caractérisée en ce que l'anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de ses fragments fonctionnels, comprend une chaîne légère comprenant au moins deux des trois CDRs ou les trois CDRs de séquence SEQ ID Nos. 2, 4 et 6, ou au moins deux de trois CDRs ou trois CDRs de séquence présentant respectivement au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 2, 4 et 6.

10 Dans un mode de réalisation encore préféré, l'invention a pour objet une composition selon l'invention, caractérisée en ce que l'anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de ses fragments fonctionnels, comprend une chaîne lourde comprenant les trois CDRs de séquence SEQ ID Nos. 8, 10 et 12, ou trois CDRs de séquence présentant respectivement au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 8, 10 et 12 et en ce qu'il comprend en outre une chaîne légère comprenant
15 les trois CDRs de séquence SEQ ID Nos. 2, 4 et 6, ou trois CDRs de séquence présentant respectivement au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 2, 4 et 6.

Dans un mode de réalisation encore préféré, l'invention a pour objet une composition selon l'invention, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR, est
20 l'anticorps monoclonal murin, dénommé 7C10, sécrété l'hybridome déposé au Centre National de Culture de Microorganisme (CNCM) (Institut Pasteur, Paris, France) le 19 septembre 2001 sous le numéro I-2717.

Dans un mode de réalisation encore préféré, l'invention a pour objet une composition selon l'invention, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR, ou l'un
25 de ses fragments fonctionnels, comprend une chaîne légère de séquence comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 54, ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 54, ou/et en ce qu'il comprend une chaîne lourde de séquence comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 69, ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement
30 optimal avec la séquence SEQ ID No. 69.

Dans un mode de réalisation encore préféré, l'invention a pour objet une composition selon l'invention, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de ses fragments fonctionnels, est un anticorps chimérique qui comprend en outre les régions constantes de chaîne légère et de chaîne lourde dérivées d'un anticorps d'une
5 espèce hétérologue à la souris, notamment de l'Homme, et de manière préférée, en ce que les régions constantes de chaîne légère et de chaîne lourde dérivées d'un anticorps humain sont respectivement la région kappa et, gamma-1 ou gamma-4.

Dans un mode de réalisation encore préféré, l'invention a pour objet une composition selon l'invention, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR, ou l'un
10 de ses fragments fonctionnels, est un anticorps humanisé qui comprend une chaîne légère et/ou une chaîne lourde dans lesquelles les segments de squelette FR1 à FR4 (tels que définis ci-après dans les exemples 12 et 13, aux tableaux 5 et 6) de ladite chaîne légère et/ou chaîne lourde sont dérivés respectivement de segments de squelette FR1 à FR4 de chaîne légère et/ou de chaîne lourde d'anticorps humains.

15 Selon un mode de réalisation préféré, ledit anticorps anti-IGF-IR humanisé, ou l'un de ses fragments fonctionnels, comprend une chaîne légère comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 61 ou 65, ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 61 ou 65, ou/et en ce qu'il comprend une chaîne lourde de séquence comprenant la séquence d'acide aminé
20 SEQ ID No. 75, 79 ou 83, ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 75, 79 ou 83.

De préférence, ledit anticorps anti-IGF-IR humanisé, ou l'un de ses fragments fonctionnels, comprend une chaîne légère comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 65, et en ce qu'il comprend une chaîne lourde de séquence comprenant la
25 séquence d'acide aminé SEQ ID No. 79 ou 83, de préférence SEQ ID No. 83.

La présente invention est également relative à une composition selon l'invention, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de sesdits fragments fonctionnels est obtenu par un procédé de préparation d'anticorps recombinants caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :



- a) la culture dans un milieu et conditions de culture appropriés d'une cellule hôte transformée par un vecteur comprenant un acide nucléique choisi parmi les acides nucléiques suivants :
- un acide nucléique codant pour un anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de ses fragments fonctionnels, tel que défini ci-avant ;
 - un acide nucléique complémentaire d'un acide nucléique tel que défini en a) ;
 - un acide nucléique comprenant au moins l'une des séquences SEQ ID No. 1, 3, 5, 7, 9 ou 11, ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 1, 3, 5, 7, 9 ou 11, et
- b) la récupération desdits anticorps, ou l'un de ses fragments fonctionnels, ainsi produits à partir du milieu de culture ou desdites cellules cultivées.

Par acide nucléique, séquence nucléique ou d'acide nucléique, polynucléotide, oligonucléotide, séquence de polynucléotide, séquence nucléotidique, termes qui seront employés indifféremment dans la présente description, on entend désigner un enchaînement précis de nucléotides, modifiés ou non, permettant de définir un fragment ou une région d'un acide nucléique, comportant ou non des nucléotides non naturels, et pouvant correspondre aussi bien à un ADN double brin, un ADN simple brin que des produits de transcription desdits ADNs.

Il doit être aussi compris ici que la présente invention ne concerne pas les séquences nucléotidiques dans leur environnement chromosomique naturel, c'est-à-dire à l'état naturel. Il s'agit de séquences qui ont été isolées et/ou purifiées, c'est-à-dire qu'elles ont été prélevées directement ou indirectement, par exemple par copie, leur environnement ayant été au moins partiellement modifié. On entend ainsi également désigner ici les acides nucléiques isolés obtenus par recombinaison génétique au moyen par exemple de cellules hôtes ou obtenus par synthèse chimique.

Par séquences nucléiques présentant un pourcentage d'identité d'au moins 80 %, de préférence 85 %, 90 %, 95 % et 98 %, après alignement optimal avec une séquence de préférence, on entend désigner les séquences nucléiques présentant, par rapport à la séquence nucléique de référence, certaines modifications comme en particulier une délétion, une troncation, un allongement, une fusion chimérique et/ou une substitution,

notamment ponctuelle. Il s'agit de préférence de séquences dont les séquences codent pour les mêmes séquences d'acides aminés que la séquence de référence, ceci lié à la dégénérescence du code génétique, ou de séquences complémentaires qui sont susceptibles de s'hybrider spécifiquement avec les séquences de référence de préférence dans des conditions de forte stringence notamment telles que définies ci-après.

Une hybridation dans des conditions de forte stringence signifie que les conditions de température et de force ionique sont choisies de telle manière qu'elles permettent le maintien de l'hybridation entre deux fragments d'ADN complémentaires. A titre illustratif, des conditions de forte stringence de l'étape d'hybridation aux fins de définir les fragments polynucléotidiques décrits ci-dessus, sont avantageusement les suivantes.

L'hybridation ADN-ADN ou ADN-ARN est réalisée en deux étapes : (1) préhybridation à 42°C pendant 3 heures en tampon phosphate (20 mM, pH 7,5) contenant 5 x SSC (1 x SSC correspond à une solution 0,15 M NaCl + 0,015 M citrate de sodium), 50 % de formamide, 7 % de sodium dodécyl sulfate (SDS), 10 x Denhardt's, 5 % de dextran sulfate et 1 % d'ADN de sperme de saumon ; (2) hybridation proprement dite pendant 20 heures à une température dépendant de la taille de la sonde (i.e.: 42°C, pour une sonde de taille > 100 nucléotides) suivie de 2 lavages de 20 minutes à 20°C en 2 x SSC + 2 % SDS, 1 lavage de 20 minutes à 20°C en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS. Le dernier lavage est pratiqué en 0,1 x SSC + 0,1 % SDS pendant 30 minutes à 60°C pour une sonde de taille > 100 nucléotides. Les conditions d'hybridation de forte stringence décrites ci-dessus pour un polynucléotide de taille définie, peuvent être adaptées par l'homme du métier pour des oligonucléotides de taille plus grande ou plus petite, selon l'enseignement de Sambrook et al., (1989, Molecular cloning : a laboratory manual. 2nd Ed. Cold Spring Harbor).

Les vecteurs, notamment les vecteurs de clonage et/ou d'expression, qui contiennent une séquence nucléique codant pour un anticorps anti-IGF-IR à l'étape a) du procédé de préparation d'anticorps anti-IGF-IR pour les compositions selon l'invention comportent de préférence des éléments qui permettent l'expression et/ou la sécrétion des séquences nucléotidiques dans une cellule hôte déterminée. Le vecteur doit alors comporter un promoteur, des signaux d'initiation et de terminaison de la traduction,



ainsi que des régions appropriées de régulation de la transcription. Il doit pouvoir être maintenu de façon stable dans la cellule hôte et peut éventuellement posséder des signaux particuliers qui spécifient la sécrétion de la protéine traduite. Ces différents éléments sont choisis et optimisés par l'homme du métier en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences nucléotidiques codant pour un anticorps anti-IGF-IR peuvent être insérées dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi, ou être des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi.

De tels vecteurs sont préparés par des méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones résultant peuvent être introduits dans un hôte approprié par des méthodes standards, telle que la lipofection, l'électroporation, le choc thermique, ou des méthodes chimiques.

Ces vecteurs sont par exemple des vecteurs d'origine plasmidique ou virale. Ils sont utiles pour transformer des cellules hôtes afin de cloner ou d'exprimer les séquences nucléotidiques codant pour un anticorps anti-IGF-IR.

L'hôte cellulaire peut être choisi parmi des systèmes procaryotes ou eucaryotes, par exemple les cellules bactériennes mais également les cellules de levure ou les cellules animales, en particulier les cellules de mammifères. On peut également utiliser des cellules d'insectes ou des cellules de plantes.

On peut également préparer les polypeptides selon l'invention par synthèse chimique. Un tel procédé de préparation est également un objet de l'invention. L'homme du métier connaît les procédés de synthèse chimique, par exemple les techniques mettant en œuvre des phases solides (voir notamment Steward et al., 1984, Solid phase peptides synthesis, Pierce Chem. Company, Rockford, 111, 2ème éd., (1984)) ou des techniques utilisant des phases solides partielles, par condensation de fragments ou par une synthèse en solution classique. Les polypeptides obtenus par synthèse chimique et pouvant comporter des acides aminés non naturels correspondant sont également compris dans l'invention.

Sous un nouvel aspect, la présente invention a pour objet une composition selon l'invention, caractérisée en ce que ledit deuxième composé est capable d'inhiber la fixation de l'EGF sur le récepteur humain EGFR et/ou capable d'inhiber l'activité tyrosine kinase du récepteur EGFR.

Parmi les deuxièmes composés capables de se fixer spécifiquement sur le récepteur EGFR, et/ou capables d'inhiber spécifiquement l'activité tyrosine kinase dudit récepteur EGFR, on peut citer d'une part :

- les anticorps anti-EGFR, ou leurs fragments fonctionnels tels que définis précédemment pour les anticorps anti-IGF-IR, tels que par exemple l'anticorps monoclonal murin dénommé 225, 579, 455 ou 528 sécrété respectivement par l'hybridome référencé à l'ATCC (« American Culture Collection ») sous les numéros HB8508, HB8506, HB8507 et HB8509 (voir le document brevet US 4,943,533, délivré le 24 juillet 1990), ses dérivés chimériques ou humanisés, l'anticorps dénommé 14E1, tel que décrit dans le document brevet US 6,129,915 délivré le 10 octobre 2000, ou encore l'anticorps monoclonal murin dénommé 425 sécrété respectivement par l'hybridome référencé à l'ATCC sous le numéro HB9629 ou ses dérivés humanisés tels que décrits dans le document brevet US 5,558,864 délivré le 24 septembre 1996, l'anticorps humanisé de type IgG2 dénommé ABX-EGF (Yang et al., Crit. Rev. Oncol. Hematol., 38 (1): 17-23, 2001) ; d'autre part :

- les inhibiteurs compétitifs de l'EGF, autres que les anticorps anti-EGFR, tels que le récepteur soluble EGFR, ou son fragment extramembranaire ; et enfin :

- les inhibiteurs spécifiques de l'activité tyrosine kinase du récepteur EGFR, tels que décrits dans la revue de Ciardiello F. (Drugs, vol.60(1):25-32, 2000), notamment page 26, tableau 1, de cette revue, en particulier les inhibiteurs décrits aussi comme actif sur les autres membres de la famille des récepteurs EGFR et, de façon encore plus préférée, ceux décrits comme sélectifs pour EGFR (voir colonne "characteristics" du tableau 1).

Dans un mode de réalisation préféré, l'invention a pour objet une composition selon l'invention, caractérisée en ce que ledit deuxième composé est choisi parmi les anticorps anti-EGFR isolés capables d'inhiber par compétition la fixation de l'EGF sur l'EGFR, ou leurs fragments fonctionnels, tels que par exemple les anticorps anti-EGF cités ci-avant.

De manière encore préférée, ledit anticorps anti-EGFR est choisi parmi les anticorps anti-EGFR monoclonaux, chimériques ou humanisés, ou leurs fragments fonctionnels.

De préférence, lesdits fragments fonctionnels de l'anticorps anti-EGFR sont choisis parmi les fragments Fv, Fab, (Fab')₂, Fab', scFv, scFv-Fc et les diabodies, ou encore tout fragment fonctionnel de ces anticorps dont la demie-vie aurait été augmentée par une modification chimique comme l'ajout de poly(alkylène) glycol tel que le poly(éthylène) glycol (PEG), ou encore par incorporation dans un liposome.

Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, la composition selon l'invention est caractérisée en ce que ledit anticorps anti-EGFR est l'anticorps monoclonal de souris 225, son dérivé chimérique souris-homme C225 (dénommé encore IMC-C225), ou un anticorps humanisé dérivé de cet anticorps 225.

Sous un autre aspect, la présente invention a pour objet une composition comprenant au moins un premier composé choisi parmi les composés capables de se fixer spécifiquement sur le récepteur humain du facteur de croissance I apparenté à l'insuline IGF-IR, et/ou capables d'inhiber spécifiquement l'activité tyrosine kinase dudit récepteur IGF-IR, de préférence tel que décrit ci-avant ; et

un deuxième composé choisi parmi les composés capables de se fixer spécifiquement sur le récepteur humain du facteur de croissance de l'épiderme EGFR, et/ou capables d'inhiber spécifiquement l'activité tyrosine kinase dudit récepteur EGFR, de préférence tel que décrit ci-avant,

comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps destinée à la prévention ou au traitement d'une maladie liée à une surexpression du récepteur IGF-IR et/ou liée à une hyperactivation de la voie de transduction du signal médié par l'interaction de l'IGF1 ou IGF2 avec IGF-IR, et, en outre, liée à une surexpression du récepteur EGFR et/ou liée à une hyperactivation de la voie de transduction du signal médié par l'interaction de l'EGF avec EGFR.

L'invention a en outre pour objet une composition selon l'invention, caractérisée en ce qu'elle comprend également un troisième composé agent cytotoxique choisi parmi les agents interagissant avec l'ADN, les antimétabolites, les inhibiteurs de topoisomérases I ou II, ou encore les agents inhibiteurs ou stabilisateurs du fuseau.

De tels agents cytotoxiques, pour chacune des classes d'agents cytotoxiques précitées, sont par exemple cités dans l'édition 2001 du VIDAL, à la page consacrée aux composés attachés à la cancérologie et l'hématologie colonne « Cytotoxiques », ces

composés cytotoxiques cités étant incorporés ici par référence à ce document comme agents cytotoxiques préférés.

Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, ladite composition selon l'invention est caractérisée en ce que ledit agent cytotoxique est choisi parmi les agents
5 inhibiteurs ou stabilisateurs du fuseau, de préférence la vinorelbine.

Dans un mode de réalisation également particulièrement préféré, ladite composition selon l'invention est caractérisée en ce que ledit agent cytotoxique est couplé chimiquement à au moins l'un desdits premier ou deuxième composé.

Afin de faciliter le couplage entre ledit agent cytotoxique et ledit anticorps selon
10 l'invention, on pourra notamment introduire des molécules espaceurs entre les deux composés à coupler, telles que des poly(alkylènes) glycols comme le poly(éthylène) glycol, ou encore des acides aminés, ou, dans un autre mode de réalisation, utiliser des dérivés actifs desdits agents cytotoxiques dans lesquels auront été introduites des fonctions capables de réagir avec ledit anticorps selon l'invention. Ces techniques de
15 couplage sont bien connues de l'homme de l'art et ne seront pas développées dans la présente description.

Sous encore un autre aspect, l'invention a pour objet une composition selon l'invention à titre de médicament.

De préférence, ladite composition selon l'invention sera additionnée d'un
20 excipient et/ou d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant à titre de principe actif :

- un premier composé choisi parmi les composés capables de se fixer spécifiquement sur le récepteur humain du facteur de croissance I apparenté à l'insuline
25 IGF-IR, et/ou capables d'inhiber spécifiquement l'activité tyrosine kinase dudit récepteur IGF-IR, de préférence tel que décrit ci-avant, notamment un anticorps anti-IGF-IR dérivé de l'anticorps 7C10, de préférence humanisé ;

- un deuxième composé choisi parmi les composés capables de se fixer spécifiquement sur le récepteur humain du facteur de croissance de l'épiderme EGFR,
30 et/ou capables d'inhiber spécifiquement l'activité tyrosine kinase dudit récepteur EGFR,



composés cytotoxiques cités par référence à ce document sont cités ici comme agents cytotoxiques préférés.

Dans un mode de réalisation particulièrement préféré, ladite composition selon l'invention est caractérisée en ce que ledit agent cytotoxique est choisi parmi les agents inhibiteurs ou stabilisateurs du fuseau, de préférence la vinorelbine.

Dans un mode de réalisation également particulièrement préféré, ladite composition selon l'invention est caractérisée en ce que ledit agent cytotoxique est couplé chimiquement à au moins l'un desdits premier ou deuxième composé.

Afin de faciliter le couplage entre ledit agent cytotoxique et ledit anticorps selon l'invention, on pourra notamment introduire des molécules espaceurs entre les deux composés à coupler, telles que des poly(alkylènes) glycols comme le poly(éthylène) glycol, ou encore des acides aminés, ou, dans un autre mode de réalisation, utiliser des dérivés actifs desdits agents cytotoxiques dans lesquels auront été introduites des fonctions capables de réagir avec ledit anticorps selon l'invention. Ces techniques de couplage sont bien connues de l'homme de l'art et ne seront pas développées dans la présente description.

Sous encore un autre aspect, l'invention a pour objet une composition selon l'invention à titre de médicament.

De préférence, ladite composition selon l'invention sera additionnée d'un excipient et/ou d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant à titre de principe actif :

- un premier composé choisi parmi les composés capables de se fixer spécifiquement sur le récepteur humain du facteur de croissance I apparenté à l'insuline IGF-IR, et/ou capables d'inhiber spécifiquement l'activité tyrosine kinase dudit récepteur IGF-IR, de préférence tel que décrit ci-avant, notamment un anticorps anti-IGF-IR dérivé de l'anticorps 7C10, de préférence humanisé ;

- un deuxième composé choisi parmi les composés capables de se fixer spécifiquement sur le récepteur humain du facteur de croissance de l'épiderme EGFR, et/ou capables d'inhiber spécifiquement l'activité tyrosine kinase dudit récepteur EGFR,

de préférence tel que décrit ci-avant, notamment un anticorps anti-EGF, de préférence humanisé ; et, le cas échéant,

- additionné d'un excipient et/ou d'un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

La présente invention comprend en outre l'utilisation d'une composition selon
5 l'invention, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement d'une maladie liée à une surexpression du récepteur IGF-IR et/ou liée à une hyperactivation de la voie de transduction du signal médié par l'interaction de l'IGF1 ou IGF2 avec IGF-IR, et, en outre, liée à une surexpression du récepteur EGFR et/ou liée à une hyperactivation de la voie de transduction du signal médié par l'interaction de l'EGF
10 avec EGFR.

De préférence, ladite utilisation selon l'invention est caractérisée en ce que l'administration dudit médicament n'induit pas ou peu d'effets secondaires liés à une inhibition du récepteur IR de l'insuline, c'est-à-dire à une inhibition de l'interaction du récepteur IR avec ses ligands naturels due à la présence dudit médicament, notamment
15 par une inhibition compétitive liée à la fixation d'un des principes actifs dudit médicament sur l'IR.

La présente invention comprend en outre l'utilisation d'une composition selon l'invention, pour la préparation d'un médicament destiné à inhiber la transformation de cellules normales en cellules à caractère tumoral, de préférence IGF dépendante, notamment IGF1 et/ou IGF2 dépendante, et EGF dépendante.
20

La présente invention comprend en outre l'utilisation d'une composition selon l'invention, pour la préparation d'un médicament destiné à inhiber la croissance et/ou la prolifération de cellules tumorales de préférence IGF dépendante, notamment IGF1 et/ou IGF2 dépendante, et EGF dépendante.

25 La présente invention comprend en outre l'utilisation d'une composition selon l'invention, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement de cancer.

De manière générale, la présente invention a pour objet l'utilisation d'un anticorps, ou l'un de ses fragments fonctionnels, de préférence humanisé, selon
30 l'invention, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement de cancer exprimant l'IGF-IR et/ou de cancer présentant une hyperactivation



de la voie de transduction du signal médié par l'interaction de l'IGF1 ou IGF2 avec IGF-IR, comme par exemple la surexpression de IRS-1, et, en outre, exprimant l'EGFR et/ou présentant une hyperactivation de la voie de transduction du signal médié par l'interaction d'EGF/EGFR.

5 Parmi les cancers qui peuvent être prévenus et/ou traités, on préfère le cancer de la prostate, les ostéosarcomes, le cancer du poumon non à petites cellules, le cancer du sein, le cancer de l'endomètre ou le cancer du côlon.

Les cancers de l'ovaire et du cerveau font également parti des cancers qui peuvent être prévenus et/ou traités par les compositions selon l'invention.

10 Sous encore un autre aspect, la présente invention a pour objet une méthode de diagnostic, de préférence *in vitro*, de maladies induites par une surexpression du récepteur IGF-IR et une surexpression du récepteur EGFR à partir d'un échantillon biologique dont on suspecte la présence anormale en récepteur IGF-IR et EGFR, caractérisée en ce qu'on met en contact ledit échantillon biologique avec un anticorps
15 IGF-IR de préférence tel que décrit ci-avant, et un anticorps EGFR tel que décrit ci-avant, lesdits anticorps pouvant être, le cas échéant, marqués.

De préférence, lesdites maladies liées par la surexpression du récepteur IGF-IR et la surexpression du récepteur EGFR dans ladite méthode de diagnostic seront des cancers.

20 Lesdits anticorps, ou l'un de leurs fragments fonctionnels, peuvent se présenter sous forme d'immunoconjugué ou d'anticorps marqué afin d'obtenir un signal détectable et/ou quantifiable.

Les anticorps marqués ou leurs fragments fonctionnels incluent par exemple des anticorps dits immunoconjugués qui peuvent être conjugués par exemple avec des
25 enzymes telles que la peroxydase, la phosphatase alcaline, l' α -D-galactosidase, la glucose oxydase, la glucose amylase, l'anhydrase carbonique, l'acétyl-cholinestérase, le lysozyme, la malate déhydrogénase ou la glucose-6 phosphate déhydrogénase ou par une molécule comme la biotine, la digoxigénine ou la 5-bromo-désoxyuridine. Des marqueurs fluorescents peuvent être également conjugués aux anticorps ou leurs
30 fragments fonctionnels et incluent notamment la fluorescéine et ses dérivés, le fluorochrome, la rhodamine et ses dérivés, la GFP (GFP pour « Green Fluorescent

Protein »), le dansyl, l'umbelliférone etc.. De tels conjugués peuvent être préparés par des méthodes connues de l'homme de l'art. Lesdits anticorps, ou leurs fragments fonctionnels, peuvent être couplés aux enzymes ou aux marqueurs fluorescents directement ou par l'intermédiaire d'un groupe espaceur ou d'un groupe de liaisons tel qu'un polyaldéhyde, comme le glutaraldéhyde, l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA), l'acide diéthylènetriaminepentaacétique (DPTA), ou en présence d'agents de couplage tels que le périodate etc.. Les conjugués comportant des marqueurs de type fluorescéine peuvent être préparés par réaction avec un isothiocyanate.

D'autres conjugués peuvent inclure également des marqueurs chimiluminescents tels que le luminol et les dioxétanes, des marqueurs bioluminescents tels que la luciférase et la luciférine, ou encore des marqueurs radioactifs.

Sous un dernier aspect, la présente invention a également pour objet une méthode *in vitro* de suivi de l'efficacité d'un traitement prophylactique et/ou thérapeutique d'un cancer IGF (1 et/ou 2) et EGF dépendant, dans lequel procédé on compare la quantité de récepteur IGF-IR et EGFR obtenue pendant ou après le traitement par rapport à la quantité de récepteur IGF-IR et EGFR obtenue avant le traitement à partir d'un échantillon biologique et dans lequel procédé le dosage desdits récepteurs comprend une étape dans laquelle on met en contact ledit échantillon biologique avec un anticorps anti-IGF-IR de préférence tel que décrit ci-avant, et un anticorps anti-EGFR, de préférence tel que décrit ci-avant, lesdits anticorps pouvant être, le cas échéant, marqués.

De préférence, l'échantillon biologique est constitué par un fluide biologique, tel que le sérum, le sang total, des cellules, un échantillon de tissu ou des biopsies d'origine humaine.

Toute procédure ou test classique peut être mise en oeuvre pour réaliser une telle détection et/ou dosage. Ledit test peut être un test par compétition ou par sandwich, ou tout test connu de l'homme de l'art dépendant de la formation d'un complexe immunitaire de type anticorps-antigène. Suivant les applications selon l'invention, l'anticorps ou l'un de ses fragments fonctionnels peut être immobilisé ou marqué. Cette immobilisation peut être réalisée sur de nombreux supports connus de l'homme de l'art. Ces supports

peuvent notamment inclure le verre, le polystyrène, le polypropylène, le polyéthylène, le dextran, le nylon, ou des celluloses naturelles ou modifiées. Ces supports peuvent être soit solubles ou insolubles.

A titre d'exemple, une méthode préférée met en jeu des processus immunoenzymatiques selon la technique ELISA, par immunofluorescence, ou radio-immunologique (RIA) ou équivalent.

Ainsi, la présente invention comprend également les kits ou nécessaires pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic de maladies induites par une surexpression ou une sousexpression du récepteur IGF-IR ou pour la mise en œuvre d'un procédé pour la détection et/ou la quantification d'une surexpression ou d'une sousexpression du récepteur IGF-IR dans un échantillon biologique, de préférence une surexpression dudit récepteur, caractérisé en ce que ledit kit ou nécessaire comprend les éléments suivants :

- a) un anticorps anti-IGF-IR et un anticorps anti-EGFR, de préférence tels que décrits ci-avant ;
- b) éventuellement, les réactifs pour la constitution du milieu propice à la réaction immunologique ;
- c) éventuellement, les réactifs permettant la mise en évidence des complexes IGF-IR/anticorps produits par la réaction immunologique.

Dans la présente description, on entend par "utilisation simultanée", l'administration des composés de la composition selon l'invention compris dans une seule et même forme pharmaceutique.

On entend par "utilisation séparée" :

- l'administration, en même temps, des deux composés de la composition selon l'invention, qui ne comprend que ledit premier composé et ledit deuxième composé, ces deuxdits premier et deuxième composés étant compris chacun dans une forme pharmaceutique distincte, ou

- l'administration, en même temps, de deux des composés de la composition selon l'invention, compris dans une seule et même forme pharmaceutique et du composé de la composition restant, compris dans une forme pharmaceutique distincte, ou

- l'administration, en même temps, des trois composés de la composition selon l'invention, compris dans des formes pharmaceutiques distinctes.

On entend par "utilisation étalée dans le temps" :

- l'administration successive, d'une part, en même temps, de deux des composés de la composition selon l'invention, compris chacun dans des formes pharmaceutiques distinctes ou dans une seule et même forme pharmaceutique, et d'autre part, du composé
5 de la composition selon l'invention restant, compris dans une forme pharmaceutique propre, ou

- l'administration successive desdits premier, deuxième et, le cas échéant, troisième composés de la composition selon l'invention, compris chacun dans une forme pharmaceutique distincte.

10 Dans le cas de cette "utilisation étalée dans le temps", le laps de temps écoulé entre l'administration du premier composé de la composition selon l'invention et l'administration du dernier composé de la même composition selon l'invention n'excède pas de préférence 1 semaine, 48 heures ou 24 heures.

D'une façon générale, la composition selon l'invention augmente
15 significativement et par synergie l'efficacité du traitement du cancer. En d'autres termes, l'effet thérapeutique par un anti-IGF-IR seul ou par un anti-EGFR seul est potentialisé de manière inattendue par la coadministration respective d'un anti-EGFR ou d'un anti-IGF-IR. Un autre avantage subséquent majeur produit par une composition selon l'invention, concerne la possibilité d'utiliser des doses efficaces en principe actif plus
20 faibles, ce qui permet d'éviter ou de réduire les risques d'apparition des effets secondaires. De plus, cette composition selon l'invention permettrait d'atteindre l'effet thérapeutique escompté plus rapidement.

Dans la présente description, on entend désigner par véhicule pharmaceutiquement acceptable, un composé ou une combinaison de composés entrant
25 dans une composition pharmaceutique ne provoquant pas de réactions secondaires et qui permet par exemple la facilitation de l'administration des composés actifs, l'augmentation de leur durée de vie et/ou de leur efficacité dans l'organisme, l'augmentation de leur solubilité en solution ou encore l'amélioration de leur conservation. Ces véhicules pharmaceutiquement acceptables sont bien connus et seront
30 adaptés par l'homme de l'art en fonction de la nature et du mode d'administration des composés actifs choisis.

De préférence, ces composés seront administrés par voie systémique, en particulier par voie intraveineuse, par voie intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale ou sous-cutanée, ou par voie orale. De manière plus préférée, la composition selon la présente invention, sera administrée à plusieurs reprises, de manière étalée dans le temps.

Leurs modes d'administration, posologies et formes galéniques optimaux peuvent être déterminés selon les critères généralement pris en compte dans l'établissement d'un traitement adapté à un patient comme par exemple l'âge ou le poids corporel du patient, la gravité de son état général, la tolérance au traitement et les effets secondaires constatés.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans la suite de la description avec les exemples et les figures dont les légendes sont représentées ci-après.

LEGENDES DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de l'IGF-IR.

Figure 2 : Schéma de la transduction des signaux médiée par l'IGF-IR lors de la fixation des IGFs.

Figures 3A, 3B et 3C : Reconnaissance de l'IGF-IR natif exprimé à la surface des cellules MCF-7 par l'anticorps monoclonal 7C10.

Pour cette expérience, les cellules MCF-7 sont incubées avec l'anticorps 7C10 ou avec un anticorps contrôle négatif, puis révélées à l'aide d'un anticorps secondaire anti-espèce fluorescent. Le marquage est lu au FACS. Le premier histogramme (figure 3A) correspond aux cellules MCF-7 seules. Dans le deuxième histogramme (figure 3B) la courbe non grisée correspond au marquage non spécifique par un anticorps murin isotype contrôle. Dans le troisième histogramme (figure 3C), la courbe non grisée montre la reconnaissance de l'IGF-IR par l'ACM 7C10.

Figures 4A, 4B et 4C : Marquage de cellules d'insectes Sf9 exprimant respectivement l'IGF-IR ou l'IR.

La figure 4A montre le marquage de cellules non transfectées seules (1) ou marquées avec des anticorps monoclonaux commerciaux témoins reconnaissant respectivement l'IGF-IR (2) ou l'IR (3). En figure 4B, des cellules Sf9 exprimant

uniquement l'IGF-IR sont marquées avec l' α IR3 (2) ou l'anti-IR (3), le pic (1) représentant les cellules seules. En figure 4C, des cellules Sf9 exprimant uniquement l'IR sont marquées avec un anti-IR (3) ou l' α IR3 (2), le pic (1) représentant les cellules seules.

- 5 Figure 5 : Effet inhibiteur de l'anticorps 7C10 sur la prolifération des cellules MCF-7 induite par l'IGF-I.

Les cellules MCF-7 sont incubées en présence de concentrations croissantes d'IGF1 en présence ou en absence des ACM à tester. La prolifération cellulaire est évaluée par suivi de l'incorporation de ^3H Thymidine. L'anticorps commercial α IR3 est
10 utilisé comme contrôle positif de l'expérience. Le 7G3 est une IgG1 murine anti-IGF-IR sans activité sur la prolifération et utilisée comme isotype contrôle.

Figures 6A, 6B et 6C :

- figure 6A : effet *in vivo* de l'anticorps monoclonal 7C10 sur la croissance de tumeurs MCF-7 établies chez la souris nude ;
- 15 - figures 6B et 6C : figures provenant respectivement des publications d'Arteaga et al., 1989 (J. Clin. Invest., 84, 1418-1423, 1989) et de Li et al., 2000 (Cancer Immunol. Immunother., 49, 243-252), et montrant pour la figure 6B l'effet de α IR3 murin et pour la figure 6C l'effet d'un scFv-Fc recombinant dérivé de l'anticorps 7H7 sur la croissance tumorale.

- 20 Figure 7 : Etude comparée de l'effet de l'AcM 7C10 et du tamoxifène sur la croissance *in vivo* de la tumeur MCF-7.

Figures 8A, 8B et 8C : Etude de l'activité antitumorale de l'anticorps murin 7C10 dans différents modèles de xénogreffe de cellules tumorales *in vivo*.

- La figure 8A montre les résultats obtenus sur un modèle d'ostéosarcome SK-ES-
25 1, la figure 8B concerne une tumeur de la prostate androgène indépendante DU-145 et la figure 8C un modèle de tumeur du poumon non à petites cellules A549. Dans ces trois modèles, le traitement a été effectué 2 fois par semaine en i.p. à raison de 250 μg /dose/souris. Les courbes 7G3, EC2 et 9G4 correspondent respectivement à trois IgG1 murines utilisées comme isotype contrôle d'expérience dans chacun des modèles.

Figure 9 : Etude de l'effet antitumoral de l'AcM 7C10 comparé à la navelbine (vinorelbine) ainsi que de la synergie des deux composés sur la croissance *in vivo* de la lignée A549.

Figure 10 : Activité comparée des AcM α IR3, 7C10 et 1H7 sur la prolifération IGF-2 induite des cellules MCF-7.

Figure 11 : Comparaison des AcM 7C10 murin et C7C10 chimérique pour l'inhibition de la prolifération IGF1 des cellules MCF-7 *in vitro*. L'anticorps 9G4 est une IgG1 murine utilisée comme isotype contrôle d'expérience.

Figure 12 : Effet comparé des AcM 7C10 et h7C10 (humanisé 1, noté ici 7H2HM) sur le modèle *in vitro* de prolifération IGF1 induite des cellules MCF-7.

Figure 13 : Effet des AcM 7C10 et h7C10 (humanisé 1, noté ici 7H2HM) sur la transduction du signal induite par l'IGF1. La première ligne de spots correspond à la révélation, par un anticorps anti-phospho-tyrosine, de la phosphorylation de la chaîne β immunoprécipitée en présence d'IGF1 seul ou d'IGF1 additionné des différents anticorps à tester. Le 9G4 et l'IgG1 sont respectivement les isotypes contrôle des formes 7C10 et h7C10. La seconde ligne de spots correspond à la révélation de la chaîne β et montre que la quantité déposée dans l'ensemble des puits est parfaitement équivalente.

Figure 14 : Séquence de l'ADNc (SEQ ID No. 48), de son brin complémentaire (SEQ ID No. 50) et sa traduction en acides aminés (SEQ ID No. 49), du fragment de PCR amplifié à partir de l'hybridome de souris 7C10 avec les amorces MKV-1 et MKC et qui code pour l'extrémité 3' du peptide leader et 7C10 VL.

Figure 15 : Séquence de l'ADNc (SEQ ID No. 51), de son brin complémentaire (SEQ ID No. 53) et sa traduction en acides aminés (SEQ ID No. 52), du fragment de PCR amplifié à partir de l'hybridome de souris 7C10 avec les couples amorces MHV-12 et MHC-1, ou MHV-8 et MHC-1 et qui code pour l'extrémité 3' du peptide leader et 7C10 VH.

Figure 16 : Reconnaissance de l'IGF-1 récepteur par l'anticorps chimérique 7C10 (surnageant de culture de cellules cos7 transfectées).

Figure 17 : Comparaison de la séquence en acides aminés de 7C10 VL de souris (SEQ ID No. 54) avec celles d'autres anticorps de souris ayant la plus forte homologie de séquence.

La numérotation des acides aminés est celle de Kabat et al. (1991). Les résidus dans les régions charpentes (hors CDRs) qui diffèrent entre 7C10 VL et Kabat sous-groupe II de souris (SEQ ID No. 57) sont soulignés. Un point indique que le résidu est identique à cette position par rapport à la séquence de 7C10 VL. DRB1-4.3 (SEQ ID No. 55) représente la séquence de la chaîne légère d'un anticorps de souris anti-human MHC CLASS II B-Chain (numéro d'accès dans la banque de données de Kabat est N011794). C94-5B11'CL (SEQ ID No. 56) représente la séquence de la chaîne légère d'un anticorps de souris (numéro d'accès dans la banque de données de Kabat est P019314).

10 Figure 18 : Comparaison des séquences en acides aminés de 7C10 VL de souris (SEQ ID No. 54) avec celles de chaînes légères humaines appartenant au sous-groupe II humain de Kabat (SEQ ID No. 60) et ayant la plus forte homologie de séquence.

Les séquences en acides aminés sont alignées et comparées avec celle de 7C10 VL de souris. Un point indique que le résidu est identique à cette position par rapport à la séquence de 7C10 VL. GM607 (SEQ ID No. 58) représente la séquence de la chaîne légère kappa sécrétée par la lignée lymphoblastoïde humaine GM607 (Klobeck et al., Nucleic Acids Res., 12:6995-7006, 1984a et Klobeck et al., Nature, 309:73-76, 1984b, le numéro d'accès dans la banque de données Kabat est N011606). DPK15/A19 (SEQ ID No. 59) représente la séquence de la lignée germinale humaine V kappa II.

20 Figure 19 : Comparaison des séquences d'acides aminés des régions variables des chaînes légères (VL) de 7C10 de souris (SEQ ID No. 54), de l'anticorps humain GM 607 (SEQ ID No. 58) et des deux versions de 7C10 humanisées 1 et 2 (SEQ ID Nos. 61 et 65).

Les séquences en acides aminés sont alignées et comparées avec celle de 7C10 VL de souris. Un point indique que le résidu est identique à cette position par rapport à la séquence de 7C10 VL. GM607 représente la séquence de la chaîne légère kappa sécrétée par la lignée lymphoblastoïde humaine GM607 (Klobeck et al., 1984a et 1984b, numéro d'accès dans la banque de données Kabat : N011606).

Figure 20 : Séquence de l'ADNc (SEQ ID No. 62), de son brin complémentaire (SEQ ID No. 64) et sa traduction en acides aminés (SEQ ID No. 63), du gène construit par

assemblage *de novo* codant pour le peptide leader et la version humanisée 1 de 7C10 VL.

Figure 21 : Séquence de l'ADNc (SEQ ID No. 66), de son brin complémentaire (SEQ ID No. 68) et sa traduction en acides aminés (SEQ ID No. 67), du gène construit par assemblage *de novo* codant pour le peptide leader et la version humanisée 2 de 7C10 VL.

Figure 22 : Comparaison des séquences en acides aminés de 7C10 VH de souris (SEQ ID No. 69) avec celles de chaînes lourdes de souris humaines appartenant au sous-groupe I(A) souris de Kabat et ayant la plus forte homologie de séquence.

La numérotation des acides aminés est celle de Kabat et al. (1991). Les résidus dans les régions charpentes (hors CDRs) qui diffèrent entre 7C10 VH et Kabat sous-groupe I(A) (SEQ ID No. 71) de souris sont soulignés. Un point indique que le résidu est identique à cette position par rapport à la séquence de 7C10 VH souris. AN03'CL (SEQ ID No. 70) représente la séquence de la chaîne lourde d'un anticorps de souris (numéro d'accès dans la banque de données de Kabat : P001289).

Figure 23 : Comparaison des séquences en acides aminés de 7C10 VH de souris (SEQ ID No. 69) avec celles de chaînes lourdes humaines appartenant au sous-groupe II humain de Kabat (SEQ ID No. 72) et ayant la plus forte homologie de séquence.

Les résidus soulignés font partie des structures canoniques définies par Chothia et al. (1989). Un point indique que le résidu est identique à cette position par rapport à la séquence de 7C10 VH souris. Human VH FUR1'CL (SEQ ID No. 73) représente la séquence de la chaîne lourde d'un anticorps humain anti-lamin B IgM/K d'origine auto-immune (Mariette et al., Arthritis and Rheumatism, 36:1315-1324, 1993 ; numéro d'accès dans Kabat : N020619). Human germline (SEQ ID No. 74) représente la séquence de la lignée germinale 4.22 VH IV humaine (Sanz et al., EMBO. J. 8:3741-3748, 1989).

Figure 24 : Comparaison des séquences d'acides aminés des régions variables des chaînes lourdes (VH) de 7C10 de souris (SEQ ID No. 69) et des trois versions humanisées par CDR-grafting VH humanisé 1, 2 et 3 (respectivement SEQ ID Nos. 75, 79 et 83).

La numérotation des résidus correspond à celle de Kabat. Les séquences sont alignées et comparées à celle de 7C10 VH de souris. Un point indique que le résidu est identique à cette position par rapport à la séquence de 7C10 VH souris.

5 Figure 25 : Séquence de l'ADNc (SEQ ID No. 76), de son brin complémentaire (SEQ ID No. 78) et sa traduction en acides aminés (SEQ ID No. 77), du gène construit par assemblage *de novo* codant pour le peptide leader et la version humanisée 1 de 7C10 VH.

10 Figure 26 : Séquence de l'ADNc (SEQ ID No. 80), de son brin complémentaire (SEQ ID No. 82) et sa traduction en acides aminés (SEQ ID No. 81), du gène construit par assemblage *de novo* codant pour le peptide leader et la version humanisée 2 de 7C10 VH.

15 Figure 27 : Séquence l'ADNc (SEQ ID No. 84), de son brin complémentaire (SEQ ID No. 86) et sa traduction en acides aminés (SEQ ID No. 85), du gène construit par assemblage *de novo* codant pour le peptide leader et la version humanisée 3 de 7C10 VH.

Figure 28 : Comparaison de l'activité de reconnaissance de l'IGF-1 récepteur par l'anticorps chimérique 7C10 (dénommé "C7C10") et sa version humanisée 1 (7C10 hum 1) en ELISA.

20 Figure 29 : Influence sur l'activité de reconnaissance de l'IGF-1 récepteur des versions humanisées 1 et 2 de la chaîne légère de l'anticorps 7C10 en ELISA.

Figure 30 : Comparaison de l'activité de reconnaissance de l'IGF-1 récepteur par l'anticorps chimérique 7C10 et trois versions humanisées de la chaîne lourde (7C10 hum 1, 2 et 3) en association avec 7C10 VL humanisée 2 en ELISA.

25 Figures 31A à 31D : Mise en évidence par un marquage au FACS de la présence de l'EGFR et de l'IGF-IR à la surface de cellules A549.

Figure 32 : Effet d'une co-administration des ACM 7C10 et 225 sur la croissance in vivo de la tumeur A549.

Exemple 1. Génération et sélection de l'anticorps monoclonal (AcM) murin.

30 Dans le but de générer des AcM dirigés spécifiquement contre l'IGF-IR et ne reconnaissant pas l'IR, un protocole comprenant 6 étapes de criblage a été envisagé.

Il consistait à :

- immuniser des souris avec l'IGF-IR recombinant, pour générer des hybridomes,
- cribler les surnageants de culture par ELISA sur la protéine recombinante ayant servi à l'immunisation,
- 5 - tester tous les surnageants d'hybridomes positifs en ELISA sur le récepteur natif surexprimé à la surface de cellules tumorales MCF-7,
- évaluer les surnageants d'hybridomes positifs dans les deux premiers criblages en terme de reconnaissance différentielle de l'IGF-IR et de l'IR sur des cellules d'insectes infectées avec des baculovirus exprimant respectivement l'IGF-IR ou l'IR,
- 10 - vérifier que les anticorps sélectionnés à cette étape étaient capables d'inhiber *in vitro* la prolifération IGF1 induite des cellules MCF-7,
- s'assurer de l'activité *in vivo*, chez la souris nude du candidat retenu en terme d'impact sur la croissance de la tumeur MCF-7.

L'ensemble de ces différentes étapes et des résultats obtenus sera brièvement
15 décrit ci-après dans l'exemple 1.

Pour l'étape d'immunisation, des souris ont été injectées deux fois, par voie sous-cutanée avec 8 µg d'IGF-IR recombinant. Trois jours avant la fusion des cellules de la rate avec les cellules du myélome murin Sp2OAg14, les souris ont été stimulées par une injection intra-veineuse de 3 µg du récepteur recombinant. Quatorze jours après
20 la fusion, les surnageants d'hybridomes ont été criblés par ELISA, sur des plaques sensibilisées par l'IGF-IR recombinant. Les hybridomes dont les surnageants ont été trouvés positifs ont été conservés et amplifiés avant d'être testés au FACScan afin de vérifier que les anticorps produits étaient également capables de reconnaître l'IGF-IR natif. Pour ce faire, des cellules MCF-7 issues d'une tumeur du sein estrogène
25 dépendante et surexprimant l'IGF-IR ont été incubées avec chacun des surnageants de culture produits par les hybridomes sélectionnés en ELISA. Les complexes récepteur natif/AcM à la surface de la cellule ont été révélés par un anticorps secondaire anti-espèce couplé à un fluorochrome. Les figures 3A à 3C montrent un histogramme type obtenu avec le surnageant de l'hybridome 7C10 (figure 3C) comparé à un marquage
30 cellules seules + anticorps secondaire (figure 3A) ou à un marquage utilisant un isotype contrôle (figure 3B).

A ce stade de la sélection, seuls les hybridomes sécrétant des AcM reconnaissant à la fois le récepteur recombinant et le récepteur natif ont été sélectionnés et clonés. Les AcM sécrétés par ces hybridomes ont été produits puis purifiés avant d'être testés au FACScan, selon la méthode décrite ci-dessus, sur des cellules d'insectes Sf9 exprimant l'IGF-IR ou l'IR afin d'éliminer les hybridomes reconnaissant à la fois les deux récepteurs. La figure 4A montre un recouvrement total des histogrammes 1, 2, 3 correspondant respectivement aux cellules non infectées + anticorps secondaires (1), aux cellules non infectées marquées par l' α IR3 (2) et aux cellules non infectées marquées par un anticorps anti-IR (3). Ce premier résultat montre bien l'absence d'IGF-IR et d'IR détectables à la surface de ces cellules d'insecte non infectées. La figure 4B montre un marquage de cellules infectées par un baculovirus exprimant l'IGF-IR. Dans cette seconde figure l' α IR3, utilisé comme témoin positif, marque bien comme attendu les cellules (pic 2), alors que l'anti-IR (pic 3) se superpose au pic de cellules seules. Enfin, en figure 4C, il est montré que l'anti-IR marque bien comme attendu les cellules Sf9 exprimant l'IR (pic 3), mais de manière inattendue, l' α IR3 décrit dans la littérature comme spécifique de l'IGF-IR, semble reconnaître également l'IR (pic 2).

Les résultats obtenus dans ce troisième système de criblage sont résumés dans le tableau 1 et montrent la génération d'un AcM : le 7C10, satisfaisant aux critères de reconnaissance de l'IGF-IR et de non reconnaissance de l'IR. L'isotypage de l'AcM 7C10 a montré qu'il s'agissait d'une IgG1.

TABEAU 1 : Réactivité comparée d'AcM 7C10 sur des cellules d'insectes Sf9 exprimant l'IGF-IR ou l'IR

	MFI (Moyenne de l'intensité de fluorescence)		
	Cellules non infectées	Cellules IGF1R +	Cellules IR +
Cellules	8	8	7
Anti-IR	4,6	9	91
Anti-IGF-IR(α IR3)	9	35	32
EC2	8	13	11
Anti-souris FITC	4,3	9	13
Milieu UltraCulture	9	10	11
15B9	7,5	25	77,8
9F5D	8	41	40
13G5	7,8	37	24
7C10	8,6	49	13

Les deux derniers criblages prévus pour la sélection de l'AcM consistaient à vérifier que ce dernier était bien capable d'inhiber la prolifération cellulaire induite par l'IGF-1 *in vitro* et *in vivo* sur la lignée cellulaire MCF-7.

Pour la sélection *in vitro*, les cellules MCF-7 ont étéensemencées, déprivées en
5 sérum de veau fœtal, puis incubées en présence de concentrations croissantes d'IGF-1
(de 1 à 50 ng/ml) en présence ou en absence de l'anticorps 7C10 à tester additionné à
une concentration finale de 10 µg/ml. Dans cette expérience, l'AcM commercial αIR3 a
été introduit comme témoin positif et l'AcM 7G3 (isolé parallèlement au 7C10 et ne
reconnaissant pas le récepteur natif) comme isotype contrôle. La prolifération cellulaire
10 est estimée par suivi au compteur β de l'incorporation de thymidine tritiée par les
cellules. Les résultats sont exprimés en index de prolifération. Les données présentées
dans la figure 5 montrent que l'IGF1 est capable de stimuler de façon dose dépendante
la prolifération des cellules MCF-7. L'AcM αIR3, utilisé comme contrôle positif inhibe
complètement la prolifération des cellules MCF-7 induite par l'IGF-1. De la même
15 manière, l'AcM 7C10 est capable d'inhiber significativement la croissance des cellules
MCF-7 induite par l'IGF-1. Enfin, l'AcM 7G3 utilisé comme contrôle isotypique
s'avère bien, comme attendu, sans effet sur la croissance cellulaire tumorale *in vitro* de
la cellule MCF-7.

La sélection *in vivo* a été effectuée dans un modèle de tumeur établie. Pour ce
20 faire, des souris nudes ont reçu un implant sous-cutané d'estrogène à libération lente,
indispensable à la prise de la tumeur dans un modèle murin. Vingt quatre heures après
implantation des estrogènes, 5.10^6 cellules MCF-7 sont greffées sur le flanc droit de la
souris en sous-cutané. Cinq jours après cette greffe cellulaire les tumeurs sont
mesurables et des lots de 6 souris sont constitués au hasard. Le traitement des souris est
25 effectué deux fois par semaine, durant 5 à 6 semaines, à la dose de 250 µg/dose/souris.
Dans le groupe contrôle, les souris sont traitées de la même façon avec un isotype
contrôle murin. Les résultats présentés dans la figure 6A montrent une inhibition très
significative de la croissance tumorale induite par l'anticorps 7C10. Cette activité est
particulièrement inattendue si l'on se réfère aux données disponibles concernant l'αIR3,
30 toujours utilisé comme référence dans le domaine du récepteur à l'IGF1, et connu pour
n'avoir aucune activité *in vivo* sur la croissance des tumeurs estrogènes dépendantes

(voir figure 6B). De même, comparé aux résultats obtenus avec l'anticorps recombinant scFv-Fc dérivé de l'AcM murin 1H7 (voir figure 6C), l'AcM 7C10 est beaucoup plus efficace dans l'inhibition *in vivo* de la croissance des cellules MCF-7.

Exemple 2. Comparaison de l'effet du 7C10 et du tamoxifen sur la croissance *in vivo* de la tumeur MCF-7

5

Dans le but de déterminer la puissance du traitement par l'anticorps 7C10 dans le cadre du cancer du sein estrogène dépendant, le 7C10 a été comparé au tamoxifen composé couramment utilisé pour le traitement du carcinome mammaire dans le cadre des formes évoluées avec progression locale et/ou métastatiques et dans le cadre de la
10 prévention des récides (voir VIDAL 2000, pages 1975-1976).

Dans les cancers du sein hormono-dépendants, il existe une corrélation significative entre l'expression des récepteurs aux estrogènes (ER) et celle de l'IGF-IR (Surmacz E. et al., Breast Cancer Res. Treat., Feb., 47(3):255-267, 1998). Par ailleurs, il semble que les estrogènes (E2) agissent en synergie avec l'IGF1 (parfois noté IGF-I ou
15 IGF1) pour stimuler la prolifération cellulaire. Il a en effet été montré qu'un traitement par E2 augmentait d'environ 10 fois le taux de mRNA de l'IGF-IR ainsi que le niveau d'expression de la protéine (Lee A.V. et al., Mol. Endocrinol., May, 13(5):787-796, 1999). Cette augmentation se traduit par une augmentation significative de la phosphorylation de l'IGF-IR. De plus, les E2 stimulent significativement l'expression
20 de l'IRS-1 ("IRS-1" pour "Insulin Receptor Substrat-1") qui est l'un des substrats de l'IGF-IR phosphorylé.

Le tamoxifen est largement utilisé depuis plusieurs années en hormonothérapie pour le traitement des patientes atteintes de cancers de sein E2-dépendants (Forbes J.F., Semin. Oncol., Feb., 24(1.Suppl.1):S1-5-S1-19, 1997). Cette molécule entre en
25 compétition avec l'estradiol et inhibe la fixation de celui-ci à son récepteur (Jordan V.C., Breast Cancer Res. Treat., 31(1):41-52, 1994). Il a par ailleurs été démontré que le tamoxifen est capable d'inhiber la prolifération IGF-IR dépendante en inhibant l'expression du récepteur et sa phosphorylation (Guvakova M.A. et al., Cancer Res., July 1, 57(13):2606-2610, 1997). L'ensemble de ces données semble indiquer que l'IGF-
30 IR est un important médiateur de la prolifération induite par l'interaction E2/ER.

L'utilisation à long terme du tamoxifène étant associée avec une augmentation significative du risque de cancer de l'endomètre (Fisher et al., J. of National Cancer Institute, 86,7:527-537, 1994 ; VIDAL 2000, 1975-1976) et de récurrence collatérale de cancer du sein E2 indépendants (Li C.I. et al., J Natl. Cancer Inst., July 4, 93(13):1008-1013, 2001). Dans ce contexte, une comparaison de l'effet antitumoral *in vivo* de l'anticorps 7C10 et du tamoxifène a été effectuée sur le modèle MCF-7 afin de déterminer la part de l'activité liée à l'IGF-IR dans la prolifération ER médiée. Pour ce faire, 7.10^6 cellules MCF-7 ont été implantées en sc (sous-cutanée) chez des souris nues, 24 heures après implantation chez ces mêmes souris d'un granule d'estradiol à libération prolongée (0,72 mg/comprimé libéré sur 60 jours), indispensable à l'établissement de toute tumeur humaine E2 dépendante chez cette espèce animale. Cinq jours après cette implantation, les tumeurs sont mesurées et des groupes de 6 souris constitués. Ces groupes sont respectivement traités avec 1) l'anticorps 7C10 injecté en ip (intra péritonéal) à raison de 250 µg/souris, 2 fois par semaine, 2) 10 µg de tamoxifène repris dans en PBS contenant 3 % hydroxypropyl-cellulose (HPC) ip ou 3) le solvant dans lequel est repris le tamoxifène (hydroxypropyl cellulose). Le tamoxifène est administré quotidiennement pendant 4 semaines excepté le week-end. Les souris traitées avec l'ACM 7C10 reçoivent également quotidiennement une injection de PBS 3 % HPC. Une étude a préalablement été effectuée pour vérifier que le solvant seul est sans influence sur la croissance tumorale.

Les résultats présentés dans la figure 7 montrent que l'ACM 7C10 est capable d'inhiber significativement (les astérisques (*) correspondent à la comparaison groupe contrôle/groupe 7C10 dans un test t) la croissance de la tumeur MCF-7 *in vivo*. De façon surprenante, l'anticorps 7C10 semble être significativement plus efficace que le tamoxifène pour l'inhibition de la croissance tumorale (les ronds (°) correspondent à la comparaison groupe Tamoxifène/groupe 7C10 dans un test t) suggérant que ce type de traitement par ACM puisse se substituer au traitement par le tamoxifène.

Exemple 3. Mise en évidence de l'activité antitumorale de l'AcM 7C10 *in vivo* sur des tumeurs humaines de différentes origines

Afin de généraliser l'activité de l'anticorps 7C10 à d'autres tumeurs exprimant le récepteur à l'IGF1, le 7C10 a été testé *in vivo* dans un modèle de tumeur de la prostate

androgène indépendant DU145, dans un modèle d'ostéosarcome SKES-1 et dans un modèle de tumeur du poumon non à petites cellules A549. Le protocole est similaire à celui décrit ci-dessus pour MCF-7 et les résultats présentés figures 8A à 8C montrent une activité significative de cet ACM dans les 3 modèles tumoraux. L'activité observée dans le modèle de tumeur de la prostate est à noter tout particulièrement dans la mesure où la simple chaîne scFv de l'ACM 1H7 est sans activité dans un modèle de tumeur de la prostate androgène indépendante (Li et al., 2000).

Exemple 4. Comparaison de l'AcM 7C10 avec la navelbine *in vivo* ; effet d'une co-administration des deux traitements

La navelbine est un composé de chimiothérapie indiqué dans le cancer du poumon non à petites cellules et dans le cancer du sein métastatique. L'étude comparative du 7C10 et de la navelbine et la synergie éventuelle entre les deux produits a été étudiée sur le modèle tumoral A549. Pour cette étude $5 \cdot 10^6$ cellules A549 ont été greffées en sous-cutané sur le flanc droit de la souris. Cinq jours après la greffe cellulaire, les tumeurs sont mesurables et les traitements avec l'AcM et/ou la navelbine sont commencés. La dose d'AcM est toujours de 250 µg/dose/souris, deux fois par semaine, en intra-péritonéale. Concernant la navelbine, elle sera administrée à la dose maximale tolérée par la souris soit 10 mg/kg, en intra-péritonéale. Pour ce traitement trois injections seront effectuées à 7 jours d'intervalle. Lors des co-administrations, les deux produits sont mélangés avant injection.

Les résultats présentés dans la figure 9 montrent de façon surprenante que, dans ce modèle, l'anticorps 7C10 est aussi actif que le traitement classique par la navelbine. Une synergie très significative des deux produits est également observée avec cinq souris sur sept ne présentant pas de tumeurs mesurables à J72.

Exemple 5. Etude de l'inhibition *in vitro* de la croissance IGF2 induite des tumeurs MCF-7

Comme signalé précédemment, l'IGF-IR est surexprimé par de nombreuses tumeurs mais il a été décrit par ailleurs que dans une bonne partie des cancers du sein et du côlon notamment, le signal de prolifération est donné à ce récepteur via l'IGF2 (parfois noté IGF-II ou IGFII). Il est donc primordial de s'assurer que l'AcM 7C10 est également capable d'inhiber la croissance IGF2 induite sur la tumeur MCF-7 *in vitro*.

Pour ce faire, des cellules ont été ensemencées en plaque 96 puits, déprivées de sérum de veau fœtal et stimulées par l'addition de 200 ng d'IGF2 par ml final de milieu, en présence et en absence des AcM à tester introduits à une concentration de 10 µg/ml. Les résultats présentés dans la figure 10 montrent que l'IGF2, comme l'IGF1 stimule
5 significativement la croissance des cellules MCF-7. L'addition d'un isotype contrôle, le 9G4 reste sans effet sur cette stimulation. Comme déjà décrit par De Léon et al. (Growth Factors, 6:327-334, 1992), aucun effet n'est observé lors de l'addition de l'AcM αIR3. En revanche, le 7C10 inhibe totalement la croissance induite par l'IGF2. Son activité est significativement meilleure que celle du 1H7.

10 **Exemple 6. Activité biologique des anticorps 7C10 chimériques (C7C10) et humanisés (h7C10)**

a) Comparaison 7C10/C7C10 et 7C10/h7C10 sur le modèle MCF-7 *in vitro*.

La forme chimérique de l'AcM 7C10 et la forme humanisée 1 (notée ici 7H2HM) purifiée ont été testées *in vitro* dans le modèle MCF-7 comme décrit ci-dessus.
15 Les résultats présentés respectivement dans les figures 11 et 12 montrent que ces deux formes ont parfaitement conservé leurs propriétés d'inhiber la croissance IGF1 induite de la tumeur MCF-7.

b) Effet comparé des AcM 7C10 et h7C10 sur la transduction du signal induit par la fixation de l'IGF1 à son récepteur.

20 L'activité d'inhibition de la croissance IGF1 induite *in vitro* sur la lignée MCF-7 devrait être la traduction d'une inhibition de la transduction du signal médié par l'IGF1 lors de la fixation de l'AcM 7C10 au récepteur. Afin de vérifier cette hypothèse, des cellules MCF-7 ont été incubées avec ou sans IGF1, en présence ou en absence des anticorps à tester. Après un temps court d'incubation, les cellules ont été lysées, la
25 chaîne β immunoprécipitée et la phosphorylation de cette sous unité estimée à l'aide d'un anticorps antiphosphotyrosine kinase. Les résultats présentés dans la figure 13 montrent que la fixation du 7C10 ou du h7C10 inhibent significativement la phosphorylation de la sous unité B de l'IGF-IR contrairement à un anticorps irrelevant murin (9G4) ou humain (noté IgG1 sur le schéma).

30 **Exemple 7. Stratégie de clonage des gènes codant pour les régions variables des chaînes lourde et légère de l'anticorps monoclonal (AcM) 7C10**

L'ARN total a été extrait à partir de 10^7 cellules d'hybridomes sécrétant l'anticorps 7C10 en utilisant le TRI REAGENT™ (selon les instructions données par le fournisseur, SIGMA, T9424). Le premier brin de cADN a été synthétisé à l'aide du kit 'First strand cDNA synthesis' d'Amersham-Pharmacia (#27-9261-01, selon les instructions données par le fournisseur). Pour les deux chaînes, la réaction a été amorcée avec l'oligonucléotide Not I-d(T)18, compris dans le Kit.

L'hybride cADN : mRNA ainsi obtenu a été utilisé pour l'amplification par PCR des gènes codant pour les chaînes lourde et légère de l'AcM 7C10. Les PCR ont été réalisées en utilisant une combinaison d'oligonucléotides spécifiques pour les chaînes lourdes et légères (Kappa) des immunoglobulines de souris. Les amorces correspondant aux extrémités 5' s'hybrident dans la région correspondant aux peptides de signal (Tableau 2 pour chaînes lourdes, Tableau 3 pour chaînes légères). Ces amorces ont été compilées à partir d'un grand nombre de séquences d'anticorps de souris trouvées dans les banques de données (Jones S.T. et al., Bio/Technology 9:88-89, 1991). Les amorces correspondant aux extrémités 3' s'hybrident dans les régions constantes des chaînes lourdes (domaine CH1 de la sous classe IgG1, non loin de la jonction V-C, amorcée MHC-1 Tableau 4) et légères (domaine Kappa non loin de la jonction V-C, amorcée MKC Tableau 4).

TABLEAU 2 : Amorces oligonucléotidiques pour la région 5' des domaines variables des chaînes lourdes d'immunoglobuline de souris (MHV) ("MHV" pour "Mouse Heavy Variable")

MHV-1 :	5' ATGAAATGCAGCTGGGTCATSTTCTT 3'	(SEQ ID No. 13)
MHV-2 :	5' ATGGGATGGAGCTRTATCATSYTCTT 3'	(SEQ ID No. 14)
MHV-3 :	5' ATGAAGWTGTGGTTAACTGGGTTTT 3'	(SEQ ID No. 15)
MHV-4 :	5' ATGRAC TTTGGGYTCAGCTTGRT 3'	(SEQ ID No. 16)
MHV-5 :	5' ATGGACTCCAGGCTCAATTAGTTTT 3'	(SEQ ID No. 17)
MHV-6 :	5' ATGGCTGTCYTRGSGCTRCTTCTTG 3'	(SEQ ID No. 18)
MHV-7 :	5' ATGGRATGGAGCKGGRTCTTTMTCTT 3'	(SEQ ID No. 19)
MHV-8 :	5' ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG 3'	(SEQ ID No. 20)

MHV-9 : 5' ATGGMTTGGGTGTGGAMCTTGCTATT 3' (SEQ ID No. 21)

MHV-10 : 5' ATGGGCAGACTTACATTCTCATTCCCT 3' (SEQ ID No. 22)

MHV-11 : 5' ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTTATTG 3' (SEQ ID No. 23)

MHV-12 : 5' ATGATGGTGTTAAGTCTTCTGTACCT 3' (SEQ ID No. 24)

5 NB KEY : R=A/G, Y=T/C, W=A/T, K=T/G, M=A/C, S=C/G.

TABLEAU 3 : Amorces oligonucléotidiques pour la région 5' des domaines variables des chaînes kappa (légères) d'immunoglobuline de souris(MKV) ("MKV" pour "Mouse Kappa Variable")

10

MKV-1 : 5' ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT 3' (SEQ ID No. 25)

MKV-2 : 5' ATGGAGWCAGACACACTCCTGYTATGGGT 3' (SEQ ID No. 26)

MKV-3 : 5' ATGAGTGTGCTCACTCAGGTCCT 3' (SEQ ID No. 27)

MKV-4 : 5' ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGG 3' (SEQ ID No. 28)

15 MKV-5 : 5' ATGGATTTWCAGGTGCAGATTWTCAGCTT 3' (SEQ ID No. 29)

MKV-5A : 5' ATGGATTTWCARGTGCAGATTWTCAGCTT 3' (SEQ ID No. 30)

MKV-6 : 5' ATGAGGTKCYTGYTSAGYTYCTGRG 3' (SEQ ID No. 31)

MKV-7 : 5' ATGGGCWTCAAGATGGAGTCACA 3' (SEQ ID No. 32)

MKV-8 : 5' ATGTGGGGAYCTKTTTYCMMTTTTTCAAT 3' (SEQ ID No. 33)

20 MKV-9 : 5' ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTT 3' (SEQ ID No. 34)

MKV-10 : 5' ATGTATATATGTTTGTGTCTATTTC 3' (SEQ ID No. 35)

MKV-11 : 5' ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTT 3' (SEQ ID No. 36)

MKV-12A : 5' ATGRAGTYWCAGACCCAGGTCTTYRT 3' (SEQ ID No. 37)

MKV-12B : 5' ATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGT 3' (SEQ ID No. 38)

25 MKV-13 : 5' ATGGATTCACAGGCCAGGTCTTAT 3' (SEQ ID No. 39)

NB KEY : R=A/G, Y=T/C, W=A/T, K=T/G, M=A/C, S=C/G.

TABLEAU 4 : Amorces oligonucléotidiques pour les extrémités 3' des gènes V_H et V_L de souris

Chaîne légère (MKC) :

5' ACTGGATGGTGGGAAGATGG 3' (SEQ ID No. 40)

Région constante du domaine Kappa de souris :

A D A A P T V S I F P P S S (SEQ ID No. 41)

GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TCC ATC TTC CCA CCA TCC AGT (SEQ ID No. 42)

10 (MKC) CC ATC TTC CCA CCA TCC AGT (SEQ ID No. 43)

Chaîne lourde (MHC-1)

5' CCAGTGGATAGACAGATG 3' (SEQ ID No. 44)

Domaine CH1 de gamma-1 de souris (sous-classe IgG1) :

A K T T P P S V Y P L (SEQ ID No. 46)

15 GCC AAA ACG ACA CCC CCA TCT GTC TAT CCA CTG (SEQ ID No. 45)

(MHC-1) CCC CCA TCT GTC TAT CCA CTG (SEQ ID No. 47)

Exemple 8. Séquences des immunoglobulines clonées à partir de l'hybridome de souris 7C10

20 En suivant la stratégie d'amplification décrite ci-dessus, des produits de PCR correspondant aux régions variables des chaînes lourde (VH) et légère (VL) ont été clonés en utilisant le « pGEM®-T Easy Vector Systems » (Promega). Pour 7C10 VL, des produits de PCR ont été obtenus avec l'amorce MKC en combinaison avec les amorces MKV1 et MKV2. Pour 7C10 VH, des produits de PCR ont été obtenus avec l'amorce MHC-1 en association avec les amorces MHV8 et MHV12. Un séquençage approfondi des produits de PCR clonés dans les vecteurs pGEM-T easy a révélé deux séquences différentes pour la chaîne légère et une séquence unique pour la chaîne lourde.

30 a) Région variable isolée à partir de l'oligo MKV1

La séquence d'ADN obtenue est caractéristique d'une région variable d'Ig fonctionnelle. Cette nouvelle séquence est donc présumée être celle codant pour 7C10 VL. Les séquences ADN (SEQ ID Nos. 48 et 50) et acides aminés (SEQ ID No. 49) du cDNA codant pour 7C10 VL sont représentées à la figure 14.

35 b) Région variable isolée à partir de l'oligo MKV2

Le gène codant pour cette chaîne légère provient d'un transcrit de mRNA aberrant qui est présent dans tous les partenaires de fusion standard dérivés de la tumeur originelle MOPC-21 dont fait parti le myélome de souris Sp2/Oag14 qui a été utilisé pour produire l'hybridome 7C10. Cette séquence comporte une recombinaison aberrante
5 entre les gènes V et J (délétion de quatre bases nucléotidiques entraînant un changement du cadre de lecture) et une mutation de la cystéine invariable en position 23 en tyrosine. Ces changements suggèrent que cette chaîne légère serait non fonctionnelle bien que néanmoins transcrite en ARN messenger. La séquence ADN de cette pseudo chaîne légère n'est pas montrée.

10 c) Région variable isolée à partir des oligos MHV8 et MHV12

Les séquences ADN obtenues avec ces deux oligos sont identiques, en dehors de la séquence codée par l'oligo lui-même. Cette séquence est une nouvelle séquence codant pour une chaîne lourde fonctionnelle présumée être celle de l'anticorps monoclonal 7C10. Les séquences ADN (SEQ ID Nos. 51 et 53) et acides aminés (SEQ
15 ID No. 52) du cDNA codant pour 7C10 VH sont représentées à la figure 15.

Exemple 9. Construction des gènes chimériques souris-homme

L'anticorps chimérique 7C10 a été construit de manière à avoir les régions 7C10 VL et VH de souris reliées aux régions constantes humaines kappa et gamma-1, respectivement. Des oligos ont été utilisés pour modifier les extrémités 5' et 3' des
20 séquences flanquant l'ADN codant pour 7C10 VL et VH afin de permettre leur clonage dans des vecteurs d'expression en cellules mammaliennes. Ces vecteurs utilisent le promoteur fort HCMV pour transcrire efficacement les chaînes lourde et légère de l'anticorps chimérique 7C10. D'autre part, ces vecteurs contiennent également l'origine de réplication de SV40 permettant une réplication efficace de l'ADN et par voie de
25 conséquence une expression transitoire des protéines en cellules cos.

Exemple 10. Expression et évaluation de l'activité de reconnaissance de l'IGF-1 récepteur de l'anticorps chimérique 7C10

Les deux plasmides contenant l'ADN codant pour l'anticorps 7C10 chimérique ont été co-transfectés dans des cellules cos-7 (ATCC number CRL-1651) pour étudier
30 l'expression transitoire de l'anticorps recombinant. Après 72 heures d'incubation, le milieu de culture a été prélevé, centrifugé pour éliminer les débris cellulaires et analysé

par technique ELISA pour la production en IgG1 humaine (voir Exemple 16) et la reconnaissance du récepteur à l'IGF-1 (voir Exemple 17).

Les tests ELISA de mesure de concentrations en IgG1/Kappa humaines ont montré que l'expression de l'anticorps chimérique 7C10 dans les cellules cos7 était comprise entre 300 et 500 ng/ml ce qui est comparable aux valeurs obtenues avec la majorité des anticorps.

Les tests ELISA de reconnaissance du récepteur à l'IGF-1 montrent que l'anticorps chimérique le reconnaît spécifiquement et avec une bonne avidité relative (voir figures 3A, 3B et 3C). Ceci apporte la preuve fonctionnelle que les bonnes VH et VL de l'anticorps 7C10 ont été identifiées. De plus, cette forme chimérique de 7C10 apparaît comme étant un outil indispensable à l'évaluation de l'affinité des formes humanisées.

Exemple 11. Modélisation moléculaire des régions variables de l'anticorps de souris 7C10

Afin d'aider et d'affiner le processus d'humanisation par « CDR-grafting », un modèle moléculaire des régions VL et VH de l'anticorps de souris 7C10 a été construit. Le modèle est basé sur la structure cristallographique de la chaîne lourde 1AY1 et de la chaîne légère 2PCP.

Exemple 12. Processus d'humanisation par CDR-grafting de la région variable de la chaîne légère de l'anticorps 7C10 (7C10 VL)

a) Comparaison de la séquence en acides aminés de 7C10 VL avec toutes les séquences de souris VL connues

Comme étape préliminaire à l'humanisation par CDR-grafting, la séquence en acides aminés de 7C10 VL a été comparée dans un premier temps à toutes les séquences de VL de souris présentes dans la banque de données de Kabat (adresse Internet : ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/database/kabat/fasta_format/, dernière mise à jour des données date de 1999). 7C10 VL a ainsi été identifié comme appartenant au sous-groupe II des chaînes légères Kappa comme défini par Kabat et al. (In *Sequences of proteins of immunological interest* (5th edn.), NIH publication No 91-3242, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, 1991). Des régions VL d'anticorps monoclonaux de souris ayant une identité

de séquences allant jusqu'à 95 % ont été identifiées (DRB1-4.3 (SEQ ID No. 55) : 95 % et C94-5B11'CL (SEQ ID No. 56) : 95 %, voir figure 17). Afin de tenter d'identifier les résidus hors du commun dans la séquence de 7C10 VL, la séquence en acides aminés de 7C10 VL (SEQ ID No. 54) a été alignée avec la séquence consensus du sous-groupe II des chaînes kappa de souris (SEQ ID No. 57) comme défini par Kabat (voir figure 17).

A la position Kabat numéro 3, la valine (V) normalement présente dans le sous-groupe II des chaînes légères Kappa selon Kabat (71 %) est remplacée par une leucine (L). Une leucine à cette position n'est pas rare puisqu'on la trouve par exemple dans DRB1-4.3 et C94-5B11'CL. D'après le modèle moléculaire, ce résidu ne semble pas jouer un rôle particulier. En conséquence la conservation de ce résidu dans la forme humanisée ne sera pas envisagée.

A la position Kabat numéro 7, la thréonine (T) normalement présente dans le sous-groupe II des chaînes légères Kappa selon Kabat (66 %) est remplacée par une isoleucine (I). Une isoleucine à cette position est relativement rare puisqu'on ne la trouve que 15 fois parmi toutes les séquences VL de souris connues et jamais parmi des séquences VL humaines. Le modèle moléculaire montre que ce résidu (I7) pointe vers la surface de la molécule mais ne contact pas les CDRs (le résidu d'un CDR le plus proche serait l'arginine à la position Kabat numéro 42). De plus, il semble peu probable que ce résidu I7 contacte directement l'antigène. En conséquence la conservation de ce résidu dans la forme humanisée ne sera pas envisagée du moins dans un premier temps.

A la position Kabat numéro 77, l'arginine (R) normalement présente dans le sous-groupe II des chaînes légères Kappa selon Kabat (95,5 %) est remplacée par une sérine (S). Une Sérine à cette position n'est pas rare.

b) Comparaison de la séquence en acides aminés de 7C10 VL avec toutes les séquences humaines VL connues

Afin d'identifier le meilleur candidat humain pour le « CDR-grafting » on a recherché la région VL kappa d'origine humaine ayant la plus grande homologie possible avec 7C10 VL. A cette fin, on a comparé la séquence en acides aminés de 7C10 VL kappa de souris avec toutes les séquences VL kappa humaines présentes dans la base de données de Kabat. 7C10 VL de souris avait la plus grande homologie de séquence avec les régions VL kappa humaines du sous-groupe II comme défini par Kabat et al.

(1991). Des régions VH d'anticorps monoclonaux d'origine humaine ont été identifiées ayant une identité de séquences allant jusqu'à 75,9 % (GM607 (SEQ ID No. 58), voir figure 18) sur la totalité des 112 acides aminés composant la région variable. Une lignée germinale d'origine humaine, DPK15/A19 (SEQ ID No. 59), ayant une identité de séquence de 76 % (voir figure 18) fut aussi identifiée. GM607 (Klobeck et al., 1984). GM607 fut donc choisi comme séquence humaine receveuse des CDRs (selon la définition de Kabat) de 7C10 VL de souris. En comparant les séquences de GM607 avec celle de la séquence consensus du sous-groupe II humain (SEQ ID No. 60) (figure 18), aucun résidu particulier dans les régions charpentes (Rch) ne put être identifié, indiquant par la même que GM607 était un bon candidat pour le CDR-grafting.

c) Versions humanisées de 7C10 VL

L'étape suivante dans le procédé d'humanisation consista à joindre les CDRs de 7C10 VL de souris aux régions charpentes (Rch) de la chaîne légère humaine sélectionnée, GM607 (Klobeck et al., 1984). A ce stade du procédé, le modèle moléculaire des régions Fv de souris de 7C10 est particulièrement utile dans le choix des résidus de souris à conserver car pouvant jouer un rôle soit dans le maintien de la structure tridimensionnelle de la molécule (structure canonique des CDRs, interface VH/VL, etc.) ou dans la liaison à l'antigène. Dans les Rch, chaque différence entre les acides aminés de souris (7C10 VL) et humain (GM607) a été examinée scrupuleusement (voir Tableau 5). De plus, les résidus particuliers à la séquence 7C10 VL de souris que l'on avait identifiés (voir Exemple 12.a)) ont été pris en compte si besoin était.

Dans la première version humanisée par « CDR-grafting » de 7C10 VL, humain 1, un seul changement dans les régions charpentes (Rch) de GM607 a été effectué. Ce changement concerne le résidu 2 (nomenclature de Kabat) situé dans Rch 1. Ce résidu entre en effet dans la composition de la structure canonique du CDR 1 de 7C10 VL et pourrait donc être critique pour le maintien de cette loupe dans sa bonne conformation. La valine présente à cette position dans la séquence 7C10 VL de souris est donc conservée à cette même position dans la forme humanisée (voir le Tableau 5 et la figure 19 pour la séquence en acides aminés (SEQ ID No. 61) et la figure 20 pour la séquence ADN (SEQ ID Nos. 62 et 64) et la séquence en acides aminés comprenant le peptide signal (SEQ ID No. 63).

Dans la deuxième version humanisée par « CDR-grafting » de 7C10 VL, humain 2, aucun changement dans les Rchs de la chaîne légère humaine GM 607 n'a été fait. Tous les résidus des Rchs sont donc d'origine humaine y compris le résidu 2 qui a donc été muté pour remplacer la valine présente dans 7C10 VL de souris par une isoleucine trouvée à cette même position dans la chaîne légère humaine GM 607 (voir le Tableau 5 et la figure 19 pour la séquence en acides aminés (SEQ ID No. 65) et la figure 21 pour la séquence ADN (SEQ ID Nos. 66 et 68) et la séquence en acides aminés comprenant le peptide signal (SEQ ID No. 67)). Cette forme humaine 2 est donc totalement humanisée (en dehors bien entendu des CDRs eux-mêmes) puisque tous les résidus des Rchs sont ceux de la chaîne légère d'origine humaine, GM 607.

TABLEAU 5 : Alignement des séquences d'acides aminés ayant conduit au dessin des régions 7C10 VL humaines refaçonnées

Kabat	#	FR ou CDR	Chaîne légère 7C10 de souris	Lignée germinale humaine DPK15/A19	GM 607	7C10 L humain 1 refaçonné	7C10 L humain 2 refaçonné	Commentaires
1	1	FR1	D	D	D	D	D	
2	2		V*	I*	I*	<u>V</u> *	I*	Cano L1 4(16) Zone Vernier
3	3		L	V	V	V	V	
4	4		M	M	M	M	M	Zone Vernier
5	5		T	T	T	T	T	
6	6		Q	Q	Q	Q	Q	
7	7		I	S	S	S	S	
8	8		P	P	P	P	P	
9	9		L	L	L	L	L	
10	10		S	S	S	S	S	
11	11		L	L	L	L	L	
12	12		P	P	P	P	P	
13	13		V	V	V	V	V	
14	14		S	T	T	T	T	
15	15		L	P	P	P	P	
16	16		G	G	G	G	G	
17	17		D	E	E	E	E	
18	18		Q	P	P	P	P	
19	19		A	A	A	A	A	
20	20		S	S	S	S	S	
21	21		I	I	I	I	I	
22	22		S	S	S	S	S	

23	23	FR1	C	C	C	C	C	
24	24	CDR1	R	R	R	R	R	
25	25		S*	S*	S*	S*	S*	Cano L1 4(16)
26	26		S	S	S	S	S	
27	27		Q	Q	Q	Q	Q	
27A	28		S	S	S	S	S	
27B	29		I*	L*	L*	i*	i*	Cano L1 4(16)
27C	30		V	L	L	i	I	
27D	31		H	H	H	H	H	
27E	32		S	S	S	S	S	
28	33		N	N	N	N	N	
29	34		G	G	G	G	G	
30	35		N	Y	Y	n	N	
31	36		T	N	N	t	T	
32	37		Y	Y	Y	Y	Y	
33	38		L*	L*	L*	L*	L*	Cano L1 4(16)
34	39	CDR1	Q	D	D	q	Q	
35	40	FR2	W	W	W	W	W	Zone Vernier
36	41		Y	Y	Y	Y	Y	VH/VL inter Zone Vernier
37	42		L	L	L	L	L	
38	43		Q	Q	Q	Q	Q	VL/VH inter
39	44		K	K	K	K	K	
40	45		P	P	P	P	P	
41	46		G	G	G	G	G	
42	47		Q	Q	Q	Q	Q	
43	48		S	S	S	S	S	
44	49		P	P	P	P	P	VL/VH inter (+)
45	50		K	Q	Q	Q	Q	
46	51		L	L	L	L	L	VL/VH inter Zone Vernier
47	52		L	L	L	L	L	Zone Vernier
48	53		I	I	I	I*	I*	Cano L2 1(7) Zone Vernier
49	54	FR2	Y	Y	Y	Y	Y	Zone Vernier
50	55	CDR2	K	L	L	k	K	
51	56		V*	G*	G*	v*	v*	Cano L2 1(7)
52	57		S*	S*	S*	S*	S*	Cano L2 1(7)
53	58		N	N	N	N	N	
54	59		R	R	R	R	R	
55	60		L	A	A	I	L	
56	61	CDR2	Y	S	S	y	Y	
57	62	FR3	G	G	G	G	G	
58	63		V	V	V	V	V	
59	64		P	P	P	P	P	
60	65		D	D	D	D	D	
61	66		R	R	R	R	R	
62	67		F	F	F	F	F	
63	68		S	S	S	S	S	

64	69		G*	G*	G*	G*	G*	Cano L2 1(7) Zone Vernier
65	70		S	S	S	S	S	
66	71		G	G	G	G	G	Zone Vernier
67	72		S	S	S	S	S	
68	73		G	G	G	G	G	Zone Vernier
69	74		T	T	T	T	T	Zone Vernier
70	75		D	D	D	D	D	
71	76		F*	F*	F*	F*	F*	Cano L1 4(16) Zone Vernier
72	77		T	T	T	T	T	
73	78		L	L	L	L	L	
74	79		K	K	K	K	K	
75	80		I	I	I	I	I	
76	81		S	S	S	S	S	
77	82		S	R	R	R	R	
78	83		V	V	V	V	V	
79	84		E	E	E	E	E	
80	85		A	A	A	A	A	
81	86		E	E	E	E	E	
82	87		D	D	D	D	D	
83	88		L	V	V	V	V	
84	89		G	G	G	G	G	
85	90		V	V	V	V	V	
86	91		Y	Y	Y	Y	Y	
87	92		Y	Y	Y	Y	Y	VL/VH inter
88	93	FR3	C	C	C	C	C	
89	94	CDR3	F	M	M	f	F	VL/VH inter
90	95		Q*	Q*	Q*	Q*	Q*	Cano L3 1(9)
91	96		G	A	A	g	G	VL/VH inter
92	97		S	L	L	s	S	
93	98		H	Q	Q	h	H	
94	99		V	T	T	v	V	
95	100		P*	P*	P*	P*	P*	Cano L3 1(9)
96	101		W		Q	w	W	VL/VH inter (+)
97	102	CDR3	T		T	T	T	
98	103	FR4	F		F	F	F	VL/VH inter (+) Zone Vernier
99	104		G		G	G	G	
100	105		G		Q	Q	Q	
101	106		G		G	G	G	
102	107		T		T	T	T	
103	108		K		K	K	K	
104	109		L		V	V	V	
105	110		E		E	E	E	
106	111		I		I	I	I	
107	112	FR4	K		K	K	K	

Légende : La première colonne (Kabat) indique la position du résidu d'acide aminé selon Kabat et al. (1991) ; la deuxième colonne (#) indique la position du résidu d'acide aminé dans la séquence régulière ; la troisième colonne (FR ou CDR) a été réalisée pour identifier facilement les segments du squelette (FR1, FR2, FR3 et FR4) et les segments CDR (CDR1, CDR2 et CDR3) ("CDR" pour "Complementary-Determining Region") avec les trois CDRs séparant les quatre FRs ; la quatrième colonne (Chaîne légère de souris 7C10) représente la séquence d'acides aminés (SEQ ID No. 54) de la région V_L de l'anticorps de souris 7C10 ; la cinquième colonne (Lignée germinale humaine DPK15/A19) représente la séquence d'acides aminés (SEQ ID No. 59) de la chaîne légère humaine V kappa II de la lignée germinale ; la sixième colonne (GM 607) représente la séquence d'acides aminés (SEQ ID No. 58) de la région V_L de l'anticorps GM 607 humain ; les septième et huitième colonnes (7C10 L humains 1 et 2 refaçonnés) représentent les séquences d'acides aminés des anticorps 7C10 VL humanisée 1 et 2 (respectivement SEQ ID Nos. 61 et 65). "*" indique les parties de la structure canonicque de la boucle CDR telle que définie par Chothia et al. (Nature, 342, 877-883, 1989).

Exemple 13. Processus d'humanisation par CDR-grafting de la région variable de la chaîne lourde de l'anticorps 7C10 (7C10 VH)

a) Comparaison de la séquence en acides aminés de 7C10 VH avec toutes les séquences de souris VH connues

Comme étape préliminaire à l'humanisation par CDR-grafting, la séquence en acides aminés de 7C10 VH a été comparée dans un premier temps à toutes les séquences de VH de souris présentes dans la banque de données de Kabat (adresse Internet : ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/database/kabat/fasta_format/, dernière mise à jour des données date de 1999). 7C10 VH a ainsi été identifié comme appartenant au sous-groupe I(A) des chaînes lourdes comme défini par Kabat et al. (1991). Des régions VH d'anticorps monoclonaux de souris ayant une identité de séquences allant jusqu'à 90,5 % ont été identifiées (AN03'CL (SEQ ID No. 70), voir figure 22). Afin de tenter d'identifier les résidus hors du commun dans la séquence de 7C10 VH, nous avons aligné la séquence en acides aminés de 7C10 VH (SEQ ID No. 69) avec la séquence consensus (SEQ ID No. 71) du sous-groupe I(A) des chaînes lourdes de souris comme défini par Kabat (voir figure 22).

Le résidu 17 (numérotation de Kabat), Thr pour la séquence consensus du sous-groupe I(A) et Ser dans 7C10 VH, est localisé à la surface de la molécule du côté de l'interface avec la région constante. Ce résidu ne semble pas important.

Le résidu 27 (numérotation de Kabat), Asp pour la séquence consensus du sous-groupe I(A) et Tyr dans 7C10 VH, est un résidu canonique pour le CDR 1. Tyr à cette position n'est pas rare et est probablement critique pour le maintien du CDR 1 dans sa bonne conformation.

Le résidu 84 (numérotation de Kabat), Thr pour la séquence consensus du sous-groupe I(A) et Asn dans 7C10 VH. Asn, a été trouvé 93 fois dans VH de souris et 3 fois dans VH humaine. D'après le modèle moléculaire, c'est un résidu de surface éloigné du paratope.

La numérotation des acides aminés est celle de Kabat et al. (1991). Les résidus dans les régions charpentes (hors CDRs) qui diffèrent entre 7C10 VH et Kabat sous-groupe I(A) de souris sont soulignés. AN03'CL représente la séquence de la chaîne lourde d'un anticorps de souris (numéro d'accès dans la banque de données de Kabat est P001289).

b) Comparaison de la séquence en acides aminés de 7C10 VH avec toutes les séquences humaines VH connues

Afin d'identifier le meilleur candidat humain pour le « CDR-grafting », on a recherché la région VH d'origine humaine ayant la plus grande homologie possible avec 7C10 VH. A cette fin on a comparé la séquence en acides aminés de 7C10 VH de souris avec toutes les séquences VH humaines présentes dans la base de données de Kabat. 7C10 VH de souris avait la plus grande homologie de séquence avec les régions VH humaines du sous-groupe II comme défini par Kabat et al. (1991). Des régions VH d'anticorps monoclonaux d'origine humaine ont été identifiées ayant une identité de séquences allant jusqu'à 67,3 % (human VH FUR1'CL (SEQ ID No. 73, voir figure 23) sur la totalité des 98 acides aminés codés par le gène variable (c'est-à-dire hors CDR3 et région J). Une lignée germinale d'origine humaine, 4.22 VH IV (Sanz et al., 1989), ayant une identité de séquence de 68,4 %, selon les mêmes critères que pour VH FUR1'CL, fut aussi identifiée (human Germ-line (SEQ ID No. 74), voir figure 23). La séquence codée par la lignée germinale 4.22 VH IV fut choisie comme séquence

humaine receveuse des CDRs (selon la définition de Kabat) de 7C10 VH de souris plutôt que VH FUR1'CL car en comparant les séquences de 4.22 VH IV et VH FUR1'CL avec celle de la séquence consensus du sous-groupe II humain (human Kabat sg II (SEQ ID No. 72), voir figure 23 et tableau 6), aucun résidu atypique dans les régions charpentes (Rch) ne put être identifié pour 4.22 VH IV alors que la présence de deux résidus atypiques (Gln et Arg aux positions 81 et 82A selon la nomenclature de Kabat, respectivement) furent identifiés dans la séquence codée par VH FUR1'CL.

c) Versions humanisées de 7C10 VH

L'étape suivante dans le procédé d'humanisation consista à joindre les CDRs de 7C10 VH de souris aux régions charpentes (Rch) de la lignée germinale humaine 4.22 VH IV (Sanz et al., 1989). A ce stade du procédé, le modèle moléculaire des régions Fv de souris de 7C10 est particulièrement utile dans le choix des résidus de souris à conserver car pouvant jouer un rôle soit dans le maintien de la structure tridimensionnelle de la molécule (structure canonique des CDRs, interface VH/VL etc.) ou dans la liaison à l'antigène (appartenance au paratope). Dans les Rch, chaque différence entre les acides aminés de souris (7C10 VH) et humain (4.22 VH IV) a été examinée scrupuleusement (voir Tableau 6). De plus, les résidus particuliers à la séquence 7C10 VH de souris que l'on avait identifiés (voir Exemple 8.a)) ont été pris en compte si besoin était.

Dans la première version humanisée par « CDR-grafting » de 7C10 VH, humanisé 1, quatre changements dans les régions charpentes (Rch) de 4.22 VH IV ont été effectués (voir le Tableau 6, figure 24 pour la séquence en acides aminés (SEQ ID No. 75) et la figure 25 pour la séquence d'ADN (SEQ ID Nos. 76 et 78) et la séquence d'acides aminés comprenant le peptide signal (SEQ ID No. 77)). Ces quatre changements concernent :

- Le résidu 30 (nomenclature de Kabat) situé dans Rch I. Ce résidu entre en effet dans la composition structurale du CDR1 de 7C10 VH (comme défini par Chothia et al., 1989) et pourrait donc être critique pour le maintien de cette loupe dans sa bonne conformation. La Thr présente à cette position dans la séquence 7C10 VH de souris est donc conservée à cette même position dans la forme humanisée.

- Le résidu 48 (nomenclature de Kabat) situé dans Rch 2. Ce résidu est proche des CDRs, bien que d'après le modèle moléculaire pas en contact direct avec ces derniers, et pourrait influencer sur leur conformation fine. La méthionine présente à cette position dans la séquence 7C10 VH de souris est donc conservée à cette même position dans la forme humanisée 1.
- Le résidu 67 (nomenclature de Kabat) situé dans Rch 3. Ce résidu est proche des CDRs et d'après le modèle moléculaire pourrait contacter la Lysine 60 (nomenclature de Kabat) dans le CDR 2. L'isoleucine présente à cette position dans la séquence 7C10 VH de souris est donc conservée à cette position dans la forme humanisée 1.
- Le résidu 71 (nomenclature de Kabat) situé dans Rch 3. Ce résidu fait partie de la structure canonique du CDR 2 et devrait donc être critique pour maintenir cette loupe dans sa bonne conformation. L'arginine présente à cette position dans la séquence 7C10 VH de souris est donc conservée à cette position dans la forme humanisée 1.

Dans la deuxième version humanisée par « CDR-grafting » de 7C10 VH, humanisé 2, deux changements dans les régions charpentes (Rch) de 4.22 VH IV ont été effectués. Ces deux changements concernent les résidus 30 et 71 (nomenclature de Kabat), déjà décrits dans la forme humanisée 1 (voir le Tableau 6, figure 24 pour la séquence en acides aminés (SEQ ID No. 79) et la figure 26 pour la séquence d'ADN (SEQ ID Nos. 80 et 82) et la séquence d'acides aminés comprenant le peptide signal (SEQ ID No. 81)).

Dans la troisième forme humanisée par « CDR-grafting » de 7C10 VH, humanisé 3, aucun changement dans les régions charpentes (Rch) de 4.22 VH IV n'a été effectué. Tous les résidus des Rchs sont donc d'origine humaine y compris les résidus 30, 48, 67 et 71 (nomenclature de Kabat) qui ont été conservés (voir le Tableau 6, figure 24 pour la séquence en acides aminés (SEQ ID No. 83) et la figure 27 pour la séquence d'ADN (SEQ ID Nos. 84 et 86) et la séquence d'acides aminés comprenant le peptide signal (SEQ ID No. 85)). Cette forme humanisée 3 est donc totalement humanisée (en dehors bien entendu des CDRs eux-mêmes comme défini par Kabat) puisque tous les résidus des Rchs sont ceux codés par le gène VH de la lignée germinale 4.22 VH IV.

TABLEAU 6 : Alignement des séquences d'acides aminés ayant conduit au dessin des régions 7C10 V_H humaines refaçonnées

Kabat	FR ou CDR	Chaîne lourde 7C10 de souris	Lignée germinale 4.22 V _H IV	FUR1'CL V _H humain	7C10 H humain 1 refaçonné	7C10 H humain 2 refaçonné	7C10 H humain 3 refaçonné	Commentaires
1	FR1	D	Q	Q	Q	Q	Q	
2		V	V	V	V	V	V	Zone Vernier
3		Q	Q	Q	Q	Q	Q	
4		L	L	L	L	L	L	
5		Q	Q	Q	Q	Q	Q	
6		E	E	E	E	E	E	
7		S	S	S	S	S	S	
8		G	G	G	G	G	G	
9		P	P	P	P	P	P	
10		G	G	G	G	G	G	
11		L	L	L	L	L	L	
12		V	V	V	V	V	V	
13		K	K	K	K	K	K	
14		P	P	P	P	P	P	
15		S	S	S	S	S	S	
16		Q	E	E	E	E	E	
17		S	T	T	T	T	T	
18		L	L	L	L	L	L	
19		S	S	S	S	S	S	
20		L	L	L	L	L	L	
21		T	T	T	T	T	T	
22		C	C	C	C	C	C	
23		S	T	T	T	T	T	
24		V	V	V	V*	V*	V*	H1 2(6) canonique

[illegible]

50	CDR2	Y	S	S	S	y	Y	y	Zone Vernier
51		I	I	M	I	I	I	I	
52		S	Y	F	S	s	S	s	
53		Y	H	H	Y	y	Y	y	
54		D	S	S	d	d	D	d	
55		G*	G*	G*	G*	G*	G*	G*	H2 l(16) canonique
56		T	S	S	t	t	T	t	
57		N	T	S	n	n	N	n	
58		N	Y	Y	n	n	N	n	
59		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
60		K	N	N	k	k	K	k	
61		P	P	P	P	P	P	P	
62		S	S	S	S	S	S	S	
63		L	L	L	L	L	L	L	
64		K	K	K	K	K	K	K	
65	CDR2	D	S	S	d	d	d	d	
66	FR3	R	R	R	R	R	R	R	
67		I	V	V	i	i	V	V	Zone Vernier Proche des CDRs
68		S	T	T	T	T	T	T	
69		I	I	I	I	I	I	I	Zone Vernier
70		T	S	S	S	S	S	S	
71		R*	V*	V*	r*	r*	r*	v*	H2 l(16) canonique Zone Vernier
72		D	D	D	D	D	D	D	
73		T	T	T	T	T	T	T	Zone Vernier
74		S	S	S	S	S	S	S	
75		K	K	K	K	K	K	K	
76		N	N	N	N	N	N	N	
77		Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
78		F	F	F	F	F	F	F	Zone Vernier
79		F	S	S	S	S	S	S	
80		L	L	L	L	L	L	L	

[illegible]

103	FR4	W		W	W	W	W	VH/VL interface (+) Zone Vernier
104		G		G	G	G	G	
105		Q		Q	Q	Q	Q	
106		G		G	G	G	G	
107		T		T	T	T	T	
108		T		L	L	L	L	
109		L		V	V	V	V	
110		T		T	T	T	T	
111		V		V	V	V	V	
112		S		S	S	S	S	
113	FR4	S		S	S	S	S	

Légende : La première colonne (Kabat) indique la position du résidu d'acide aminé selon Kabat et al. (1991) ; la deuxième colonne (FR ou CDR) a été réalisée pour identifier facilement les segments du squelette (FR1, FR2, FR3 et FR4) et les segments CDR (CDR1, CDR2 et CDR3) avec les trois CDRs séparant les quatre FRs ; la troisième colonne (Chaîne lourde de souris 7C10) représente la séquence d'acides aminés (SEQ ID No. 69) de la région V_H de l'anticorps de souris 7C10 ; la quatrième colonne (Lignée germinale 4.22 VH IV) représente la séquence d'acides aminés du gène 4.22 VH IV (Sanz et al., 1989) (SEQ ID No. 74) ; la cinquième colonne (FUR1'CL VH humaine, kabat numéro d'accèsion N020619) représente la séquence d'acides aminés (SEQ ID No. 73) IgMK antilamine B d'origine humaine (Mariette et al., 1993) ; les sixième, septième et huitième colonnes (7C10 H humains 1, 2 et 3 refaçonnés) représentent les séquences d'acides aminés de la région V_H de 7C10 humain refaçonné respectivement pour les versions 1 (SEQ ID No. 75), 2 (SEQ ID No. 79) et 3 (SEQ ID No. 83). "*" indique les parties de la structure canonique de la boucle CDR telle que définie par Chothia et al. (1989).

Exemple 14. Construction des gènes codant pour les versions humanisées 1 de 7C10 VL et VH par assemblage d'oligonucléotides.

a) Principe

Les gènes (peptide leader + régions variables VDJ pour VH ou VJ pour VK) codant pour les régions variables humanisées ont été synthétisées par assemblage en phase solide sur billes magnétiques cotées à la streptavidine. Les gènes codant pour 7C10 VH humanisée (445 paires de bases) et 7C10 VL humanisée (433 paires de bases) sont construits en fusionnant deux fragments d'ADN grâce à la présence d'un site de restriction KpnI présent dans les deux séquences et situé à peu près à la moitié du gène (à 200 et 245 nucléotides par rapport à l'extrémité 5' du gène pour VL et VH, respectivement). Les deux fragments qui sont fusionnés ensemble sont eux-mêmes assemblés par une technique d'assemblage qui consiste à utiliser des oligonucléotides phosphorylés (environ 30-35 mer) hybridés deux par deux (un oligo sens et l'autre antisens, sur une homologie d'environ 50 %) de façon à ce qu'ils se chevauchent lors de l'élongation. Un premier oligonucléotide biotinylé en 5' est fixé sur les billes magnétiques puis les paires d'oligonucléotides phosphorylés sont rajoutées une par une. La liaison phosphodiester entre les oligonucléotides phosphorylés juxtaposés est réalisée par l'enzyme T4 DNA ligase.

Les gènes ainsi synthétisés *de novo* peuvent être directement clonés (par digestion avec des enzymes de restriction compatibles avec le vecteur d'expression choisi) ou amplifié par PCR pour obtenir plus de matériel en préambule au clonage directionnel par digestion enzymatique. La séquence du gène ainsi construit par assemblage *de novo* est alors vérifiée par séquençage automatique de l'ADN.

b) Protocole expérimental de la technique d'assemblage *de novo*

Des oligonucléotides phosphorylés en 5' ou biotinylés en 5' dont la concentration a été ajustée à 100 μ M ont été commandés chez MWG Biotech (voir les séquences des oligonucléotides utilisés dans le Tableau 7 pour la construction de 7C10 VL humanisée, et le Tableau 8 pour la construction de 7C10 VH humanisée). Les oligonucléotides ont été hybridés par paires (un mélange équimolaire, 500 pmoles, d'un oligo sens et d'un oligo antisens dans le tampon T4 DNA ligase est chauffé à 95°C pendant 5 minutes puis

laissé à refroidir sur la paillasse jusqu'à température ambiante) selon un schéma décrit dans le Tableau 9.

Le premier oligonucléotide biotinylé est fixé sur des billes magnétiques cotées à la streptavidine (Dynabeads M-280 Streptavidin, Dynal product no 112-05). Pour cela, à 5 50 µl de billes décantées (utilisation d'un porte aimant) préalablement lavées deux fois avec 100 µl de tampon TE 1X (tampon Tris-EDTA 100X : 1M Tris-HCl, pH 8, 0,1 M EDTA, Sigma T-9285) on ajoute 500 pmol de l'oligonucléotide biotinylé dans une solution NaCl à 15 mM. Après une incubation à 37°C pendant 15 min, les billes sont lavées deux fois avec le tampon de lavage (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM EDTA et 10 50 mM NaCl) et les couples d'oligonucléotides hybridés sont alors ajoutés un par un. A chaque rajout d'une paire d'oligonucléotides on chauffe à 95°C pendant 5 min puis on laisse refroidir sur la paillasse jusqu'à température ambiante. Une fois cette la température ambiante atteinte, on ajoute de 2 µl de T4 DNA ligase à 10 U/µl (Biolabs) et on incube pendant 20 min à 37°C. Les billes sont ensuite lavées (tampon de lavage) et 15 les paires d'oligonucléotides suivantes sont ajoutées ainsi de suite.

Le dernier oligo (antisens) non apparié est assemblé de la façon suivante. 5 µl d'oligo (500 pmol) et 43 µl de tampon T4 DNA ligase sont ajoutées aux billes décantées puis on chauffe le mélange à 95°C pendant 5 min et on le laisse refroidir sur la paillasse jusqu'à température ambiante. Une fois la température ambiante atteinte on ajoute 2 µl 20 de T4 DNA ligase et on incube à 37°C pendant 20 min. Les billes sont ensuite lavées deux fois avec le tampon de lavage puis deux fois avec le tampon TE 1X.

Les billes peuvent alors être conservées à 4°C avant de procéder au clonage et séquençage du gène assemblé *de novo*.

25 **TABLEAU 7 : Séquence d'ADN des oligonucléotides ayant été utilisés pour la construction de 7C10 VL humanisée 1 par assemblage *de novo***

LeaderMluI.biotin	5'-GTCAGAACGCGTGCCGCC	(SEQ ID No. 87)
7C10Lresh.1sens	5'-ACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT	(SEQ ID No. 88)
30 7C10Lresh.2sens	5'-GATGTTCTGGTTTCCTGCTTCCAGCAGTGATG	(SEQ ID No. 89)
7C10Lresh.3sens	5'-TTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCC	(SEQ ID No. 90)
7C10Lresh.4sens	5'-GTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTG	(SEQ ID No. 91)



	7C10Lresh.5sens	5'-CAGGTCTAGTCAGACCATTATACATAGTAATG	(SEQ ID No. 92)
	7C10Lresh.6sens	5'-GAAACACCTATTTGGAATGGTACCTGCAGA	(SEQ ID No. 93)
	7C10Lresh.7anti	5'-GGCAACTTCATGGTGGCGGCACGCGTTCTGAC	(SEQ ID No. 94)
	7C10Lresh.8anti	5'-GAAACCAGAACATCAGCACCAACAGCCTAACA	(SEQ ID No. 95)
5	7C10Lresh.9anti	5'-CTGAGTCATCACAACATCACTGCTGGAAGCAG	(SEQ ID No. 96)
	7C10Lresh.10anti	5'-TCTCCAGGGGTGACGGGCAGGGAGAGTGGAGA	(SEQ ID No. 97)
	7C10Lresh.11anti	5'-TCTGACTAGACCTGCAGGAGATGGAGGCCGGC	(SEQ ID No. 98)
	7C10Lresh.12anti	5'-AAATAGGTGTTTCCATTACTATGTACAATGC	(SEQ ID No. 99)
	7C10Lresh.13sens	5'-CAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATAAA	(SEQ ID No. 100)
10	7C10Lresh.14sens	5'-GTTTCTAATCGGCTTTATGGGGTCCCTGACAG	(SEQ ID No. 101)
	7C10Lresh.15sens	5'-GTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTTA	(SEQ ID No. 102)
	7C10Lresh.16sens	5'-CACTGAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGAT	(SEQ ID No. 103)
	7C10Lresh.17sens	5'-GTTGGGGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTTACA	(SEQ ID No. 104)
	7C10Lresh.18sens	5'-TGTTCCGTGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGG	(SEQ ID No. 105)
15	7C10Lresh.19sens	5'-TGGAATCAAACGTGAGTGGATCCTCTGCG	(SEQ ID No. 106)
	7C10Lresh.KpnIREV	5'-TCTGCAGGTACCATTGC	(SEQ ID No. 107)
	7C10Lresh.KpnIbiotin	5'-TGCAATGGTACCTGCAGAAGC	(SEQ ID No. 108)
	7C10Lresh.20anti	5'-AGACTGCCCTGGCTTCTGCAGGTACCATTGCA	(SEQ ID No. 109)
	7C10Lresh.21anti	5'-CGATTAGAACTTTATAGATCAGGAGCTGTGG	(SEQ ID No. 110)
20	7C10Lresh.22anti	5'-TGCCACTGAACCTGTGAGGGACCCCATAAAGC	(SEQ ID No. 111)
	7C10Lresh.23anti	5'-GATTTTCAGTGTAATCTGTGCCTGATCCAC	(SEQ ID No. 112)
	7C10Lresh.24anti	5'-TAAACCCCAACATCCTCAGCCTCCACTCTGCT	(SEQ ID No. 113)
	7C10Lresh.25anti	5'-TCCACGGAACATGTGAACCTTGAAAGCAGTAA	(SEQ ID No. 114)
	7C10Lresh.26anti	5'-TTTGATTTCCACCTTGGTCCCTTGGCCGAAC	(SEQ ID No. 115)
25	7C10Lresh.BamHIantisens	5'-CGCAGAGGATCCACTCACG	(SEQ ID No. 116)

TABLEAU 8 : Séquence d'ADN des oligonucléotides ayant été utilisés pour la construction de 7C10 VH humanisée 1 par assemblage *de novo*

30	LeaderMluI.biotin	5'-GTCAGAACGCGTGCCGCC	(SEQ ID No. 117)
	7C10Hresh.1sens	5'-ACCATGAAAGTGTGAGTCTGTTGTACCTCTTGA	(SEQ ID No. 118)
	7C10Hresh.2sens	5'-CAGCCATTCTGGTATCCTGTCTCAGGTGCAGCT	(SEQ ID No. 119)
	7C10Hresh.3sens	5'-TCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG	(SEQ ID No. 120)
	7C10Hresh.4sens	5'-GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGT	(SEQ ID No. 121)

	7C10Hresh.5sens	5'-TACTCCATCACCGGTGGTTATTTATGGAAGTGG	(SEQ ID No. 122)
	7C10Hresh.6sens	5'-ATACGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGG	(SEQ ID No. 123)
	7C10Hresh.7sens	5'-ATGGGGTATATCAGCTACGACGGTACCAATAAC	(SEQ ID No. 124)
	7C10Hresh.8antisens	5'-TCAACACTTTTCATGGTGGCGGCACGCGTTCTGAC	(SEQ ID No. 125)
5	7C10Hresh.9antisens	5'-ATACCAGGAATGGCTGTCAAGAGGTACAACAGAC	(SEQ ID No. 126)
	7C10Hresh.10antisens	5'-TGGGCCCCGACTCCTGAAGCTGCACCTGAGACAGG	(SEQ ID No. 127)
	7C10Hresh.11antisens	5'-TGAGGGACAGGGTCTCCGAAGGCTTCACCAGTCC	(SEQ ID No. 128)
	7C10Hresh.12antisens	5'-CCACCGGTGATGGAGTAACCAGAGACAGTGCAGG	(SEQ ID No. 129)
	7C10Hresh.13antisens	5'-CCCTGGGGGCTGCCGTATCCAGTTCATAAATAA	(SEQ ID No. 130)
10	7C10Hresh.14antisens	5'-TAGCTGATATACCCCATCCACTCCAGTCCCTT	(SEQ ID No. 131)
	7C10Hresh.KpnIREV	5'-GTTATTGGTACCGTCG	(SEQ ID No. 132)
	7C10Hresh.KpnIbiotin	5'-TACGACGGTACCAATAACTAC	(SEQ ID No. 133)
	7C10Hresh.15sens	5'-AAACCCTCCCTCAAGGATCGAATCACCATATC	(SEQ ID No. 134)
	7C10Hresh.16sens	5'-ACGTGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGA	(SEQ ID No. 135)
15	7C10Hresh.17sens	5'-AGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACTGCA	(SEQ ID No. 136)
	7C10Hresh.18sens	5'-GTGTATTACTGTGCGAGATACGGTAGGGTCTT	(SEQ ID No. 137)
	7C10Hresh.19sens	5'-CTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCA	(SEQ ID No. 138)
	7C10Hresh.20sens	5'-CCGTCTCCTCAGGTGAGTGGATCCTCTGCG	(SEQ ID No. 139)
	7C10Hresh.21antisens	5'-AGGGAGGGTTTGTAGTTATTGGTACCGTCGTA	(SEQ ID No. 140)
20	7C10Hresh.22antisens	5'-ACGTGTCACGTGATATGGTGATTCGATCCTTG	(SEQ ID No. 141)
	7C10Hresh.23antisens	5'-AGAGCTCAGCTTCAGGGAGAACTGGTTCTTGG	(SEQ ID No. 142)
	7C10Hresh.24antisens	5'-CAGTAATACACTGCAGTGTCCGCAGCGGTCAC	(SEQ ID No. 143)
	7C10Hresh.25antisens	5'-AGTAGTCAAAGAAGACCCTACCGTATCTCGCA	(SEQ ID No. 144)
	7C10Hresh.26antisens	5'-CTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTCCTGGCCCC	(SEQ ID No. 145)
25	7C10Hresh.BamHIantisens	5'-CGCAGAGGATCCACTCAC	(SEQ ID No. 146)

TABLEAU 9 : Protocole d'appariement des oligonucléotides pour l'assemblage *de novo* des gènes codant pour les formes humanisées de 7C10 VH et VL

30	Assemblage <i>de novo</i> du fragment MluI – KpnI de 7C10 VL humanisée 1	Assemblage <i>de novo</i> du fragment KpnI - BamHI de 7C10 VL humanisée 1
	Oligo leader MluI 7C10 VL Biotinylé Couple d'oligo 1 et 7	Oligo 7C10 L KpnI Biotinylé Couple d'oligo 13 et 20
35	Couple d'oligo 2 et 8	Couple d'oligo 14 et 21

5	Couple d'oligo 3 et 9 Couple d'oligo 4 et 10 Couple d'oligo 5 et 11 Couple d'oligo 6 et 12 Oligo antisens 7C10 VL KpnI	Couple d'oligo 15 et 22 Couple d'oligo 16 et 23 Couple d'oligo 17 et 24 Couple d'oligo 18 et 25 Couple d'oligo 19 et 26 Oligo antisens 7C10 L BamHI
10	Assemblage <i>de novo</i> du fragment MluI – KpnI de 7C10 VH humanisée 1	Assemblage <i>de novo</i> du fragment KpnI - BamHI de 7C10 VH humanisée 1
15	Oligo leader MluI 7C10 VH Biotinylé Couple d'oligo 1 et 8 Couple d'oligo 2 et 9 Couple d'oligo 3 et 10 Couple d'oligo 4 et 11 Couple d'oligo 5 et 12 Couple d'oligo 6 et 13 Couple d'oligo 7 et 14 Oligo antisens 7C10 VH KpnI	Oligo 7C10 H KpnI Biotinylé Couple d'oligo 15 et 21 Couple d'oligo 16 et 22 Couple d'oligo 17 et 23 Couple d'oligo 18 et 24 Couple d'oligo 19 et 25 Couple d'oligo 20 et 26 Oligo antisens 7C10 VH BamHI
20		

Exemple 15. Construction des gènes codant pour les versions humanisées 2 de 7C10 VL et 7C10 VH et 3 de 7C10 VH par mutagenèse dirigée.

La version humanisée 2 de 7C10 VH a été obtenue par mutation dirigée des résidus 48 et 67 (selon la nomenclature de Kabat) de la version 1. Cette mutagenèse dirigée a été réalisée à l'aide du système QuikChange™ Site-directed mutagenesis de Stratagene (kit #200518) selon le protocole décrit par le fabricant. La construction s'est faite en deux temps, dans un premier temps le résidu 48 sur la version 1 a été muté à l'aide du couple d'amorces 7C10Hhumanisé1QCM48 sens et antisens (voir Tableau 10) et dans un deuxième temps cette version mutée au résidu 48 a elle-même été mutée au résidu 67 à l'aide du couple d'amorces 7C10Hhumanisé1QCI67 sens et antisens (voir Tableau 10).

La version humanisée 3 de 7C10 VH a été obtenue par mutation dirigée des résidus 30 et 71 (selon la nomenclature de Kabat) de la version 2 en utilisant également le système QuikChange™. Cette construction s'est faite en deux temps. Dans un premier temps, le résidu 30 sur la version 2 a été muté à l'aide des amorces 7C10HhumaniséQCT30 sens et antisens (voir Tableau 10). Dans un deuxième temps, cette version mutée au résidu 30 a elle-même été mutée au résidu 71 en utilisant le couple d'amorces 7C10Hhumanisé1V67QCR71 sens et antisens (voir Tableau 10).

La version humanisée 2 de 7C10 VL a été obtenue par mutation dirigée du résidu 2 (selon la nomenclature de Kabat) de la version 1 en utilisant le système QuikChange™. Le résidu 2 sur la version 1 a été muté en utilisant le couple d'amorces 7C10L humanisé1QCV2 sens et antisens (voir Tableau 10).

5

TABLEAU 10 : Liste des oligonucléotides utilisés pour la mutagenèse dirigée par le système QuikChange™ de stratagène

7C10Hhumanisé1QCT30. sens	5'-CTGGTTACTCCATCAGCGGTGGTTATTTATG	(SEQ ID No. 147)
7C10Hhumanisé1QCT30. antisens	5'-CATAAATAACCACCGCTGATGGAGTAACCAG	(SEQ ID No. 148)
7C10Hhumanisé1QCM48. sens	5'-GGGACTGGAGTGGATCGGGTATATCAGCTAC	(SEQ ID No. 149)
7C10Hhumanisé1QCM48. antisens	5'-GTAGCTGATATACCCGATCCACTCCAGTCCC	(SEQ ID No. 150)
7C10Hhumanisé1QCI67. sens	5'-TCCCTCAAGGATCGAGTCACCATATCACGTG	(SEQ ID No. 151)
7C10Hhumanisé1QCI67. antisens	5'-CACGTGATATGGTGACTCGATCCTTGAGGGA	(SEQ ID No. 152)
7C10Hhumanisé1V67QCR71. sens	5'- -GATCGAGTCACCATATCAGTGGACACGTCCAAGAA CCAG	(SEQ ID No. 153)
7C10Hhumanisé1V67QCR71. antisens	5'- -CTGGTTCTTGGACGTGTCCACTGATATGGTGACTC GATC	(SEQ ID No. 154)
7C10Lhumanisé1QCV2. sens	5'-GCTTCCAGCAGTGATATTGTGATGACTCAGT	(SEQ ID No. 155)
7C10Lhumanisé1QCV2. antisens	5'-ACTGAGTCATCACAATATCACTGCTGGAAGC	(SEQ ID No. 156)

10 **Exemple 16. Transfection des cellules cos7 par électroporation**

Les vecteurs d'expression mammalienne contenant les versions chimériques ou humanisées des chaînes lourdes et légères de l'anticorps 7C10 ont été testés en cellules cos7 pour l'expression transitoire des anticorps recombinants 7C10. L'ADN a été introduit dans les cellules cos par électroporation à l'aide d'un instrument Biorad (Gene
15 Pulsar). L'ADN (10 µg de chaque vecteur) est ajouté à des aliquotes de 0,8 ml de cellules cos à une concentration de 1×10^7 cellules par ml dans du tampon PBS (sans Ca^{++} et Mg^{++}). Une pulsation de 1,900 volts et d'une capacité de 25 µF a été délivrée. Les cellules cos transfectées sont alors ajoutées à 8 ml de milieu DMEM contenant 5 % de sérum de veau et incubées à 37°C pendant 72 heures. Le surnageant est alors récolté,



centrifugé pour éliminer les débris cellulaires et testé par ELISA pour la mesure de sa concentration en anticorps 7C10 recombinant de type IgG1/Kappa humaine.

Exemple 17. Méthode ELISA pour mesurer les concentrations en anticorps recombinants IgG1/Kappa humain présentes dans le surnageant des transfectants cos

Les surnageants produits par expression transitoire en cellules cos7 ont été testés pour la présence d'anticorps 7C10 de type IgG1/Kappa humaine. Pour la détection de l'immunoglobuline IgG1/Kappa humaine, des plaques ELISA de 96 puits (Maxisorb, Nunc) ont été cotées avec un anticorps polyclonal de chèvre anti-IgG humaine (spécifique pour le fragment Fc gamma, Jackson Immuno-Research Laboratories Inc., #109-005-098). Les surnageants de cellules cos ont été dilués en série et ajoutés aux puits cotés. Après une incubation d'une heure à 37°C et lavage, un anticorps polyclonal de chèvre anti-chaîne légère Kappa humaine conjugué à peroxydase (HRP, Sigma, A-7164) a été ajouté. Après 45 minutes d'incubation à 37°C et lavage, le substrat TMB (KPL #50-76-04) a été ajouté. Après 10 minutes d'incubation la réaction fut stoppée par l'addition d'acide sulfurique 1M et la densité optique lue à 450 nm. Une immunoglobuline humaine IgG1/Kappa humaine purifiée (Sigma, I-3889) de concentration connue a été utilisée comme anticorps de référence standard.

Exemple 18. Méthode ELISA pour déterminer l'activité de reconnaissance des anticorps recombinants 7C10 de type IgG1/Kappa humains sur le récepteur à l'IGF-1 (IGF-IR)

Les surnageants de culture cos7 ont été testés pour leur capacité à reconnaître l'IGF-1 R par une méthode ELISA. Des plaques ELISA de 96 puits (Dynex Immulon 2HB) ont été cotées avec 100 µl par puit d'une solution de PBS contenant 0,31 ng/µl d'IGF-1 R (Human Insulin-like Growth Factor I soluble Receptor, R & D Systems, #391-GR) par incubation pour une nuit à 4°C. Après lavage avec du PBS contenant 0,05 % Tween 20, les plaques ont été saturées par l'addition d'une solution de PBS contenant 0,5 % Gélatine et incubation à 37°C pendant 1 heure. Après 3 lavages avec du PBS, les échantillons de surnageants cos à tester, préalablement dilués en série dans du PBS contenant 0,1 % Gelatine et 0,05 % Tween 20, ont été ajoutés aux plaques. Après une incubation à 37°C pendant 1 heure suivie de 3 lavages (PBS contenant 0,05 %

Tween 20), un anticorps anti-IgG humaine (spécifique pour le fragment Fc) conjugué à la peroxydase (HRP, Jackson Immuno-Research Laboratories Inc., #109-035-098) a été ajouté (dilution au 1/5000 dans du PBS contenant 0,1 % Gélatine et 0,05 % Tween 20). Après 45 minutes d'incubation à 37°C et «3 lavages (PBS contenant 0,05 % Tween 20), le substrat TMB (KPL #50-76-04) a été ajouté. Après 10 minutes d'incubation la réaction fut stoppée par l'addition d'acide sulfurique 1M et la densité optique lue à 450 nm.

Exemple 19. Détermination de l'activité de reconnaissance de l'IGF1-R par les différentes versions de l'anticorps 7C10 humanisé par « CDR-grafting »

Dans un premier temps, nous avons comparé l'activité de reconnaissance des formes humanisées 1 des chaînes lourde et légère de 7C10 pour l'IGF-1 récepteur par rapport à la forme chimérique. La figure 28 montre les résultats d'un test ELISA de reconnaissance de l'IGF-1R (voir Exemple 18) à partir de surnageants de cellules cos7 dont la concentration en IgG1/Kappa humaine avait été préalablement déterminée par ELISA (voir Exemple 17). Les courbes de titration des quatre anticorps recombinants testés se chevauchent parfaitement indiquant que leurs affinités relatives pour l'IGF-1R sont très similaires. On en conclut donc que la forme humanisée 1 de 7C10, composée de la chaîne légère humanisée 1 (1 seul résidu de souris présent dans les régions charpentes) en combinaison avec la chaîne lourde humanisée 1 (4 résidus de souris présents dans les régions charpentes), reconnaît spécifiquement l'IGF-1 récepteur et a une affinité très similaire à celle de l'anticorps chimérique (régions variables de souris).

Dans un deuxième temps, nous avons regardé l'influence du résidu 2 (selon la nomenclature de Kabat) de la chaîne légère humanisée de 7C10 (version humanisée 1 versus humanisée 2, voir figure 19) sur la reconnaissance de l'IGF-1R. La figure 29 montre les résultats du test ELISA de reconnaissance de l'IGF-1R (voir Exemple 18) à partir de surnageants de cellules cos7 dont la concentration en IgG1/Kappa humaine avait été préalablement déterminée par ELISA (voir Exemple 17). Les deux versions humanisées 1 et 2 de la chaîne légère ont été associées successivement avec 7C10 VH humanisée 1. Les courbes de titration des deux combinaisons se superposent indiquant que la mutation du résidu 2 de la chaîne légère, qui a été changé d'une valine dans la

version humanisée 1 pour une isoleucine dans la forme humanisée 2, n'a apparemment aucune influence sur l'affinité relative de reconnaissance de l'IGF1 récepteur. La forme humanisée 2 de la chaîne légère de 7C10 constitue ainsi une version ou aucun résidu de souris (hors CDRs) n'a été conservé. Cette version, totalement humanisée, représente la version préférée de 7C10 VL.

La version totalement humanisée de la chaîne légère 7C10 (version humanisée 2, voir ci-dessus) a été testée en association avec les trois versions humanisées de la chaîne lourde de 7C10. La figure 30 montre les résultats du test ELISA de reconnaissance de l'IGF-1R à partir de surnageants de cellules cos7 dont la concentration en IgG1/Kappa humaine avait été préalablement déterminée par ELISA (voir Exemple 17). Les courbes de titration sont très similaires et se chevauchent pratiquement avec la courbe référence correspondant à l'anticorps chimérique, indiquant que les trois versions humanisées 1, 2 et 3 de 7C10 VH donne une même affinité relative pour l'IGF-1R quand elles sont associées à 7C10 VL humanisée 2. D'autres tests ELISA menés en parallèle (résultats non montrés) ont toutefois révélé qu'une mutation ponctuelle du résidu 71 (nomenclature de Kabat) d'une arginine (souris) à une valine (humain) entraînait une petite perte d'affinité de l'anticorps correspondant pour l'IGF-1R. Il est ainsi raisonnable de penser que 7C10 VH humanisée 2 a la même affinité relative pour l'IGF-1R que 7C10 VH humanisée 1. Cette forme humanisée 2 sera donc préférée par rapport à la forme 1 puisqu'elle ne comporte que deux acides aminés de souris (résidus 30 et 71, voir figure 24). La forme humanisée 3 qui ne comporte plus aucun résidu de souris (en dehors des CDRs) sera elle aussi préférée puisqu'elle ne semble entraîner qu'une perte minimale d'affinité.

Ainsi, il apparaît que deux formes humanisées de l'anticorps 7C10 selon la présente invention sont particulièrement préférées. Une forme constituée de l'association de 7C10 VH humanisée 2 (2 résidus de souris conservés) avec 7C10 VL humanisée 2 (aucun résidu de souris conservé) et une autre forme constituée de l'association de 7C10 VH humanisée 3 (aucun résidu de souris conservé) avec 7C10 VL humanisée 2 (aucun résidu de souris conservé). Cette dernière forme constitue la version humanisée ultime puisqu'aucun résidu de souris n'est présent à la fois dans les chaînes lourde et légère.

Exemple 20. Expression de l'EGFR et de l'IGF-IR à la surface des cellules A549

La synergie d'action obtenue par la co-administration de deux ACM respectivement dirigés contre l'IGF-IR et l'EGFR a été étudiée chez des souris nudes porteuses d'une tumeur du poumon non à petites cellules établie par injection sous cutanée (s.c.) de cellules A549 (lignée cellulaire de carcinome de poumon).

Dans un premier temps, et afin de s'assurer de la présence des deux récepteurs IGF-IR et EGFR à la surface de la cellule A549 avant d'injecter celle-ci à la souris, un marquage pour lecture FACS de ces cellules a été réalisé avec respectivement l'ACM murin 7C10 anti-IGF-IR (figure 31B) et l'ACM murin 225 anti-EGFR (figure 31D).

Pour ce faire, les cellules ont été saturées 30 min à 4°C avec une solution de PBS 10 % SVF (Sérum de veau foetal), lavées puis incubées 30 min à 4°C avec l'ACM d'intérêt. Après 3 nouveaux lavages, l'anticorps secondaire anti-espèce couplé au FITC (isothiocyanate de fluoroscéïne) est ajouté. Après 30 min d'incubation la lecture au FACS (« Fluorescence Activated Cells Sorter ») est effectuée à 520 nm (excitation 488 nm).

Les résultats présentés dans les figures 31A à 31D montrent que les cellules A549 présentent à leur surface un nombre comparable de récepteurs à l'EGF et à l'IGF1. Dans les deux cas la population est homogène par rapport à la distribution de chacun des récepteurs. La spécificité du marquage est confirmée par l'utilisation d'un contrôle isotypique (figure 31C). Ces résultats valident l'utilisation de la cellule A549 comme modèle pour l'étude d'une synergie d'action sur deux récepteurs IGF-IR et EGFR et pour l'étude d'une collaboration de ces deux récepteurs.

Exemple 21. Synergie d'action d'un ACM anti-IGF-IR et d'un ACM anti-EGFR coadministrés *in vivo*, chez la souris nude dans le cadre d'un traitement antitumoral.

Pour cette étude, des souris nudes sont greffées en s.c. avec 5.10^6 cellules A549. Cinq jours après la greffe de cellules, les tumeurs sont mesurées et un lot homogène de souris en terme de volume tumoral est constitué. A partir de ce lot des groupes de 6 souris sont générés au hasard. Ces souris seront traitées en intra péritonéal (i.p.), 2 fois par semaine avec chacun des ACM 7C10 et 225 individuellement à la dose de

250 µg/souris ou avec les deux ACM en co-administration. L'ACM 9G4 est administré comme contrôle isotypique d'expérience.

Les résultats présentés dans la figure 32 montrent que chacun des anticorps 7C10 et 225 administrés seuls est capable d'induire une diminution significative de la croissance tumorale *in vivo*. On peut noter que les deux ACM testés ont une activité comparable sur la croissance de la tumeur A549. De façon surprenante par rapport à la littérature, une synergie significative est observée lors de l'administration simultanée des deux ACM ($p < \text{ou} = \text{à } 0.01$ à chacun des temps de la cinétique dans un test t) suggérant qu'il existe une collaboration des deux récepteurs pour la croissance optimale d'une tumeur *in vivo* et que, contrairement aux données de la littérature, le blocage de l'un des deux axes ne suffit pas à inhiber totalement la croissance médiée par le second.

REVENDICATIONS

1. Composition comprenant :

- un premier composé choisi parmi les composés capables de se fixer
5 spécifiquement sur le récepteur humain du facteur de croissance I apparenté à l'insuline
IGF-IR, et/ou capables d'inhiber spécifiquement l'activité tyrosine kinase dudit récepteur
IGF-IR ; et

- un deuxième composé choisi parmi les composés capables de se fixer
spécifiquement sur le récepteur humain du facteur de croissance de l'épiderme EGFR,
10 et/ou capables d'inhiber spécifiquement l'activité tyrosine kinase dudit récepteur EGFR.

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit premier
composé est un anticorps IGF-IR isolé, ou l'un de ses fragments fonctionnels.

3. Composition selon la revendication 2, caractérisée en ce que ledit
anticorps est choisi parmi les anticorps monoclonaux, chimériques ou humanisés anti-
15 IGF-IR.

4. Composition selon la revendication 2 ou 3, caractérisée en ce que lesdits
fragments fonctionnels de l'anticorps anti-IGF-IR sont choisis parmi les fragments Fv,
Fab, (Fab')₂, Fab', scFv, scFv-Fc et les diabodies, ou toute forme dont la demie-vie aurait
été augmentée.

20 5. Composition selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que
ledit premier composé anticorps anti-IGF-IR ne se fixe pas de manière significative au
récepteur humain IR de l'insuline.

6. Composition selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisée en ce que
ledit anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de sesdits fragments fonctionnels, comprend une
25 chaîne légère comprenant au moins une région CDR déterminant la complémentarité
choisie parmi les CDRs de séquence SEQ ID No. 2, 4 ou 6, ou au moins un CDR dont la
séquence présente au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence
SEQ ID No. 2, 4 ou 6, ou en ce qu'il comprend une chaîne lourde comprenant au moins
un CDR choisie parmi les CDRs de séquence SEQ ID Nos. 8, 10 et 12, ou au moins un
30 CDR dont la séquence présente au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec
la séquence SEQ ID No. 8, 10 et 12.

REVENDICATIONS

1. Composition comprenant :
 - un premier composé choisi parmi les composés qui se fixent spécifiquement sur le récepteur humain du facteur de croissance I apparenté à l'insuline IGF-IR, et/ou qui inhibent spécifiquement l'activité tyrosine kinase dudit récepteur IGF-IR ; et
 - un deuxième composé choisi parmi les composés qui se fixent spécifiquement sur le récepteur humain du facteur de croissance de l'épiderme EGFR, et/ou qui inhibent spécifiquement l'activité tyrosine kinase dudit récepteur EGFR.
2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit premier composé est un anticorps IGF-IR isolé, ou l'un de ses fragments fonctionnels.
3. Composition selon la revendication 2, caractérisée en ce que ledit anticorps est choisi parmi les anticorps monoclonaux, chimériques ou humanisés anti-IGF-IR.
4. Composition selon la revendication 2 ou 3, caractérisée en ce que lesdits fragments fonctionnels de l'anticorps anti-IGF-IR sont choisis parmi les fragments Fv, Fab, (Fab')₂, Fab', scFv, scFv-Fc et les diabodies, ou toute forme dont la demie-vie aurait été augmentée.
5. Composition selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que ledit premier composé anticorps anti-IGF-IR ne se fixe pas de manière significative au récepteur humain IR de l'insuline.
6. Composition selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de sesdits fragments fonctionnels, comprend une chaîne légère comprenant au moins une région CDR déterminant la complémentarité choisie parmi les CDRs de séquence SEQ ID No. 2, 4 ou 6, ou au moins un CDR dont la séquence présente au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 2, 4 ou 6, ou en ce qu'il comprend une chaîne lourde comprenant au moins un CDR choisie parmi les CDRs de séquence SEQ ID Nos. 8, 10 et 12, ou au moins un CDR dont la séquence présente au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 8, 10 et 12.

REVENDICATIONS

1. Composition comprenant :

- un premier composé choisi parmi les composés qui se fixent spécifiquement sur le récepteur humain du facteur de croissance I apparenté à l'insuline IGF-IR, et/ou qui inhibent spécifiquement l'activité tyrosine kinase dudit récepteur IGF-IR ; et

- un deuxième composé choisi parmi les composés qui se fixent spécifiquement sur le récepteur humain du facteur de croissance de l'épiderme EGFR, et/ou qui inhibent spécifiquement l'activité tyrosine kinase dudit récepteur EGFR.

2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que ledit premier composé est un anticorps anti-IGF-IR isolé, ou l'un de ses fragments fonctionnels.

3. Composition selon la revendication 2, caractérisée en ce que ledit anticorps est choisi parmi les anticorps monoclonaux, chimériques ou humanisés anti-IGF-IR.

4. Composition selon la revendication 2 ou 3, caractérisée en ce que lesdits fragments fonctionnels de l'anticorps anti-IGF-IR sont choisis parmi les fragments Fv, Fab, (Fab')₂, Fab', scFv, scFv-Fc et les diabodies, ou toute forme dont la demi-vie aurait été augmentée.

5. Composition selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisée en ce que ledit premier composé anticorps anti-IGF-IR ne se fixe pas de manière significative au récepteur humain IR de l'insuline.

6. Composition selon l'une des revendications 2 à 5, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de sesdits fragments fonctionnels, comprend une chaîne légère comprenant au moins une région CDR déterminant la complémentarité choisie parmi les CDRs de séquence SEQ ID No. 2, 4 ou 6, ou au moins un CDR dont la séquence présente au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 2, 4 ou 6, ou en ce qu'il comprend une chaîne lourde comprenant au moins un CDR choisie parmi les CDRs de séquence SEQ ID Nos. 8, 10 et 12, ou au moins un CDR dont la séquence présente au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 8, 10 et 12.

7. Composition selon l'une des revendications 2 à 6, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de sesdits fragments fonctionnels, comprend une chaîne lourde comprenant au moins un CDR de séquence SEQ ID No. 12 ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimale avec la séquence SEQ ID No. 12.

8. Composition selon l'une des revendications 2 à 7, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de sesdits fragments fonctionnels, comprend une chaîne lourde comprenant au moins deux des trois CDRs ou les trois CDRs de séquence SEQ ID Nos. 8, 10 et 12, ou au moins deux de trois CDRs ou trois CDRs de séquence présentant respectivement au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 8, 10 et 12.

9. Composition selon l'une des revendications 2 à 8, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de sesdits fragments fonctionnels, comprend une chaîne légère comprenant au moins un CDR choisie parmi les CDRs de séquence SEQ ID No. 2, 4 ou 6, ou un CDR dont la séquence présente au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 2, 4 ou 6.

10. Composition selon l'une des revendications 2 à 9, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de sesdits fragments fonctionnels, comprend une chaîne légère comprenant au moins deux des trois CDRs ou les trois CDRs de séquence SEQ ID Nos. 2, 4 et 6, ou au moins deux de trois CDRs ou trois CDRs de séquence présentant respectivement au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 2, 4 et 6.

11. Composition selon l'une des revendications 2 à 10, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de sesdits fragments fonctionnels, est sécrété par l'hybridome murin déposé à la CNCM, Institut Pasteur, Paris, le 19 septembre 2001 sous le numéro I-2717.

12. Composition selon l'une des revendications 2 à 11, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de sesdits fragments fonctionnels, comprend une chaîne légère de séquence comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 54, ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimale avec la séquence SEQ ID No. 54, ou/et en ce qu'il comprend une chaîne lourde de séquence

7. Composition selon l'une des revendications 2 à 6, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de sesdits fragments fonctionnels, comprend une chaîne lourde comprenant au moins un CDR de séquence SEQ ID No. 12 ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimale avec la séquence SEQ ID No. 12.

8. Composition selon l'une des revendications 2 à 7, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de sesdits fragments fonctionnels, comprend une chaîne lourde comprenant au moins deux des trois CDRs ou les trois CDRs de séquence SEQ ID Nos. 8, 10 et 12, ou au moins deux de trois CDRs ou trois CDRs de séquence présentant respectivement au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 8, 10 et 12.

9. Composition selon l'une des revendications 2 à 8, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de sesdits fragments fonctionnels, comprend une chaîne légère comprenant au moins un CDR choisie parmi les CDRs de séquence SEQ ID No. 2, 4 ou 6, ou un CDR dont la séquence présente au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 2, 4 ou 6.

10. Composition selon l'une des revendications 2 à 9, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de sesdits fragments fonctionnels, comprend une chaîne légère comprenant au moins deux des trois CDRs ou les trois CDRs de séquence SEQ ID Nos. 2, 4 et 6, ou au moins deux de trois CDRs ou trois CDRs de séquence présentant respectivement au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 2, 4 et 6.

11. Composition selon l'une des revendications 2 à 10, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de sesdits fragments fonctionnels, est sécrété par l'hybridome murin déposé à la CNCM, Institut Pasteur, Paris, le 19 septembre 2001 sous le numéro I-2717.

12. Composition selon l'une des revendications 2 à 11, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de sesdits fragments fonctionnels, comprend une chaîne légère de séquence comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 54, ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimale avec la séquence SEQ ID No. 54, ou/et en ce qu'il comprend une chaîne lourde de séquence

comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 69, ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 69.

13. Composition selon l'une des revendications 4 à 12, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de sesdits fragments, est un anticorps chimérique
5 comprenant en outre les régions constantes de chaîne légère et de chaîne lourde dérivées d'un anticorps humain.

14. Composition selon la revendication 13, caractérisée en ce que lesdites régions constantes de chaîne légère et de chaîne lourde dérivées dudit anticorps humain sont respectivement la région kappa et, gamma-1 ou gamma-4.

10 15. Composition selon l'une des revendications 4 à 12, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de sesdits fragments, est un anticorps humanisé comprenant une chaîne légère et/ou une chaîne lourde dans lesquelles les segments de squelette FR1 à FR4 de ladite chaîne légère et/ou chaîne lourde sont dérivés respectivement de segments de squelette FR1 à FR4 de chaîne légère et/ou de chaîne
15 lourde d'anticorps humains.

16. Composition selon la revendication 15, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR comprend une chaîne légère comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 61 ou 65, ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 61 ou 65, ou/et en ce qu'il comprend
20 une chaîne lourde de séquence comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 75, 79 ou 83, ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 75, 79 ou 83.

17. Composition selon la revendication 15 ou 16, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR comprend une chaîne légère comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 65, et en ce qu'il comprend une chaîne lourde de séquence comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 79 ou 83, de préférence SEQ ID No. 83.

18. Composition selon l'une des revendications 2 à 17, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de sesdits fragments fonctionnels, capable d'inhiber
30 la fixation de l'IGF1 et/ou IGF2 sur le récepteur IGF-IR humain est obtenu par voie recombinante.

comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 69, ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 69.

13. Composition selon l'une des revendications 4 à 12, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de sesdits fragments, est un anticorps chimérique
5 comprenant en outre les régions constantes de chaîne légère et de chaîne lourde dérivées d'un anticorps humain.

14. Composition selon la revendication 13, caractérisée en ce que lesdites régions constantes de chaîne légère et de chaîne lourde dérivées dudit anticorps humain sont respectivement la région kappa et, gamma-1 ou gamma-4.

10 15. Composition selon l'une des revendications 4 à 12, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de sesdits fragments, est un anticorps humanisé comprenant une chaîne légère et/ou une chaîne lourde dans lesquelles les segments de squelette FR1 à FR4 de ladite chaîne légère et/ou chaîne lourde sont dérivés respectivement de segments de squelette FR1 à FR4 de chaîne légère et/ou de chaîne
15 lourde d'anticorps humains.

16. Composition selon la revendication 15, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR comprend une chaîne légère comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 61 ou 65, ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 61 ou 65, ou/et en ce qu'il comprend
20 une chaîne lourde de séquence comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 75, 79 ou 83, ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 75, 79 ou 83.

17. Composition selon la revendication 15 ou 16, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR comprend une chaîne légère comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 65, et en ce qu'il comprend une chaîne lourde de séquence
25 comprenant la séquence d'acide aminé SEQ ID No. 79 ou 83, de préférence SEQ ID No. 83.

18. Composition selon l'une des revendications 2 à 17, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de sesdits fragments fonctionnels, qui inhibe la
30 fixation de l'IGF1 et/ou IGF2 sur le récepteur IGF-IR humain est obtenu par voie recombinante.

19. Composition selon l'une des revendications 2 à 18, dans laquelle ledit anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de sesdits fragments fonctionnels, est obtenu par un procédé de préparation d'anticorps recombinants, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 5 a) la culture dans un milieu et conditions de culture appropriés d'une cellule hôte transformée par un vecteur comprenant un acide nucléique choisi parmi les acides nucléiques suivants :
- un acide nucléique codant pour un anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de ses fragments fonctionnels, tel que défini dans l'une des revendications 2 à 17 ;
 - 10 - un acide nucléique complémentaire d'un acide nucléique tel que défini en a) ; et
 - un acide nucléique comprenant au moins l'une des séquences SEQ ID No. 1, 3, 5, 7, 9 ou 11, ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 1, 3, 5, 7, 9 ou 11, et
- b) la récupération desdits anticorps, ou l'un de ses fragments fonctionnels, ainsi produits
- 15 à partir du milieu de culture ou desdites cellules cultivées.

20. Composition selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisée en ce que ledit deuxième composé est capable d'inhiber la fixation de l'EGF sur le récepteur humain EGFR et/ou capable d'inhiber l'activité tyrosine kinase du récepteur EGFR.

21. Composition selon la revendication 20, caractérisée en ce que ledit

20 deuxième composé est choisi parmi les anticorps anti-EGFR isolés, ou leurs fragments fonctionnels, capables d'inhiber par compétition la fixation de l'EGF sur l'EGFR.

22. Composition selon la revendication 20 ou 21, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-EGFR est choisi parmi les anticorps anti-EGFR monoclonaux, chimériques ou humanisés, ou leurs fragments fonctionnels.

23. Composition selon la revendication 21 ou 22, caractérisée en ce que

25 lesdits fragments fonctionnels de l'anticorps anti-EGFR sont choisi parmi les fragments Fv, Fab, (Fab')₂, Fab', scFv, scFv-Fc et les diabodies, ou toute forme dont la demie-vie aurait été augmentée.

24. Composition selon l'une des revendication 20 à 23, caractérisée en ce que

30 ledit anticorps anti-EGFR est l'anticorps monoclonal de souris 225, son dérivé chimérique souris-homme C225, ou un anticorps humanisé dérivé de cet anticorps 225.

19. Composition selon l'une des revendications 2 à 18, dans laquelle ledit anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de sesdits fragments fonctionnels, est obtenu par un procédé de préparation d'anticorps recombinants, ledit procédé étant caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- 5 a) la culture dans un milieu et conditions de culture appropriés d'une cellule hôte transformée par un vecteur comprenant un acide nucléique choisi parmi les acides nucléiques suivants :
- un acide nucléique codant pour un anticorps anti-IGF-IR, ou l'un de ses fragments fonctionnels, tel que défini dans l'une des revendications 2 à 17 ;
 - 10 - un acide nucléique complémentaire d'un acide nucléique tel que défini en a) ; et
 - un acide nucléique comprenant au moins l'une des séquences SEQ ID No. 1, 3, 5, 7, 9 ou 11, ou une séquence présentant au moins 80 % d'identité après alignement optimal avec la séquence SEQ ID No. 1, 3, 5, 7, 9 ou 11, et
- b) la récupération desdits anticorps, ou l'un de ses fragments fonctionnels, ainsi produits
- 15 à partir du milieu de culture ou desdites cellules cultivées.

20. Composition selon l'une des revendications 1 à 19, caractérisée en ce que ledit deuxième composé inhibe la fixation de l'EGF sur le récepteur humain EGFR et/ou inhibe l'activité tyrosine kinase du récepteur EGFR.

21. Composition selon la revendication 20, caractérisée en ce que ledit

20 deuxième composé est choisi parmi les anticorps anti-EGFR isolés, ou leurs fragments fonctionnels, qui inhibent par compétition la fixation de l'EGF sur l'EGFR.

22. Composition selon la revendication 21, caractérisée en ce que ledit anticorps anti-EGFR est choisi parmi les anticorps anti-EGFR monoclonaux, chimériques ou humanisés, ou leurs fragments fonctionnels.

25 23. Composition selon la revendication 21 ou 22, caractérisée en ce que lesdits fragments fonctionnels de l'anticorps anti-EGFR sont choisis parmi les fragments Fv, Fab, (Fab')₂, Fab', scFv, scFv-Fc et les diabodies, ou toute forme dont la demi-vie aurait été augmentée.

24. Composition selon l'une des revendication 21 à 23, caractérisée en ce que

30 ledit anticorps anti-EGFR est l'anticorps monoclonal de souris 225, son dérivé chimérique souris-homme C225, ou un anticorps humanisé dérivé de cet anticorps 225.



25. Composition comprenant au moins un premier composé tel que décrit dans l'une des revendications 1 à 19, et un deuxième composé tel que décrit selon l'une des revendications 20 à 24, comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps destinée à la prévention ou au traitement d'une maladie liée à une surexpression du récepteur IGF-IR et/ou liée à une hyperactivation de la voie de transduction du signal médié par l'interaction de l'IGF1 ou IGF2 avec IGF-IR, et, en outre, liée à une surexpression du récepteur EGFR et/ou liée à une hyperactivation de la voie de transduction du signal médié par l'interaction de l'EGF avec EGFR.

26. Composition selon l'une des revendications 1 à 25, comprenant en outre un troisième composé agent cytotoxique choisi parmi les agents interagissant avec l'ADN, les antimétabolites, les inhibiteurs de topoisomérases I ou II, ou encore les agents inhibiteurs ou stabilisateurs du fuseau.

27. Composition selon la revendication 26, caractérisée en ce que ledit agent cytotoxique est couplé chimiquement à au moins l'un desdits premier ou deuxième composés.

28. Composition selon la revendication 26 ou 27, caractérisée en ce que ledit agent cytotoxique est choisi parmi les agents inhibiteurs ou stabilisateurs du fuseau, de préférence la vinorelbine.

29. Composition selon l'une des revendications 1 à 28, à titre de médicament.

30. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 29 pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement d'une maladie liée à une surexpression du récepteur IGF-IR et/ou liée à une hyperactivation de la voie de transduction du signal médié par l'interaction de l'IGF1 ou IGF2 avec IGF-IR, et, en outre, liée à une surexpression du récepteur EGFR et/ou liée à une hyperactivation de la voie de transduction du signal médié par l'interaction de l'EGF avec EGFR.

31. Utilisation selon la revendication 30, caractérisée en ce que l'administration dudit médicament n'induit pas ou peu d'effets secondaires liés à une inhibition du récepteur IR de l'insuline.

32. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 32 pour la préparation d'un médicament destiné à inhiber la transformation de cellules normales en

25. Composition comprenant au moins un premier composé tel que décrit dans l'une des revendications 1 à 19, et un deuxième composé tel que décrit selon l'une des revendications 20 à 24, comme produit de combinaison pour une utilisation simultanée, séparée ou étalée dans le temps destinée à la prévention ou au traitement d'une maladie liée à une surexpression du récepteur IGF-IR et/ou liée à une hyperactivation de la voie de transduction du signal médié par l'interaction de l'IGF1 ou IGF2 avec IGF-IR, et, en outre, liée à une surexpression du récepteur EGFR et/ou liée à une hyperactivation de la voie de transduction du signal médié par l'interaction de l'EGF avec EGFR.

26. Composition selon l'une des revendications 1 à 25, comprenant en outre un troisième composé agent cytotoxique choisi parmi les agents interagissant avec l'ADN, les antimétabolites, les inhibiteurs de topoisomérases I ou II, ou encore les agents inhibiteurs ou stabilisateurs du fuseau.

27. Composition selon la revendication 26, caractérisée en ce que ledit agent cytotoxique est couplé chimiquement à au moins l'un desdits premier ou deuxième composés.

28. Composition selon la revendication 26 ou 27, caractérisée en ce que ledit agent cytotoxique est choisi parmi les agents inhibiteurs ou stabilisateurs du fuseau, de préférence la vinorelbine.

29. Composition selon l'une des revendications 1 à 28, à titre de médicament.

30. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 29 pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement d'une maladie liée à une surexpression du récepteur IGF-IR et/ou liée à une hyperactivation de la voie de transduction du signal médié par l'interaction de l'IGF1 ou IGF2 avec IGF-IR, et, en outre, liée à une surexpression du récepteur EGFR et/ou liée à une hyperactivation de la voie de transduction du signal médié par l'interaction de l'EGF avec EGFR.

31. Utilisation selon la revendication 30, caractérisée en ce que l'administration dudit médicament n'induit pas ou peu d'effets secondaires liés à une inhibition du récepteur IR de l'insuline.

32. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 29 pour la préparation d'un médicament destiné à inhiber la transformation de cellules normales en

cellules à caractère tumoral, de préférence IGF dépendante, notamment IGF1 et/ou IGF2 dépendante, et EGF dépendante.

33. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 33 pour la préparation d'un médicament destiné à inhiber la croissance et/ou la prolifération de
5 cellules tumorales de préférence IGF dépendante, notamment IGF1 et/ou IGF2 dépendante, et EGF dépendante.

34. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 34, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement de cancer.

35. Utilisation selon la revendication 34, caractérisée en ce que ledit cancer
10 est un cancer choisi parmi le cancer de la prostate, les ostéosarcomes, le cancer du poumon non à petites cellules, le cancer du sein, le cancer de l'endomètre ou le cancer du côlon.

36. Méthode de diagnostic *in vitro* de maladies induites par une surexpression du récepteur IGF-IR et une surexpression du récepteur EGFR à partir d'un échantillon
15 biologique dont on suspecte la présence anormale en récepteur IGF-IR et EGFR, caractérisée en ce qu'on met en contact ledit échantillon biologique avec un anticorps anti-IGF-IR tel que décrit dans l'une des revendications 2 à 19, et un anticorps anti-EGFR tel que décrit selon l'une des revendications 21 à 24, lesdits anticorps pouvant être, le cas échéant, marqués.

cellules à caractère tumoral, de préférence IGF dépendante, notamment IGF1 et/ou IGF2 dépendante, et EGF dépendante.

33. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 29 pour la préparation d'un médicament destiné à inhiber la croissance et/ou la prolifération de
5 cellules tumorales de préférence IGF dépendante, notamment IGF1 et/ou IGF2 dépendante, et EGF dépendante.

34. Utilisation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 29, pour la préparation d'un médicament destiné à la prévention ou au traitement de cancer.

35. Utilisation selon la revendication 34, caractérisée en ce que ledit cancer
10 est un cancer choisi parmi le cancer de la prostate, les ostéosarcomes, le cancer du poumon non à petites cellules, le cancer du sein, le cancer de l'endomètre ou le cancer du côlon.

36. Méthode de diagnostic *in vitro* de maladies induites par une surexpression du récepteur IGF-IR et une surexpression du récepteur EGFR à partir d'un échantillon
15 biologique dont on suspecte la présence anormale en récepteur IGF-IR et EGFR, caractérisée en ce qu'on met en contact ledit échantillon biologique avec un anticorps anti-IGF-IR tel que décrit dans l'une des revendications 2 à 19, et un anticorps anti-EGFR tel que décrit selon l'une des revendications 21 à 24, lesdits anticorps pouvant être, le cas échéant, marqués.

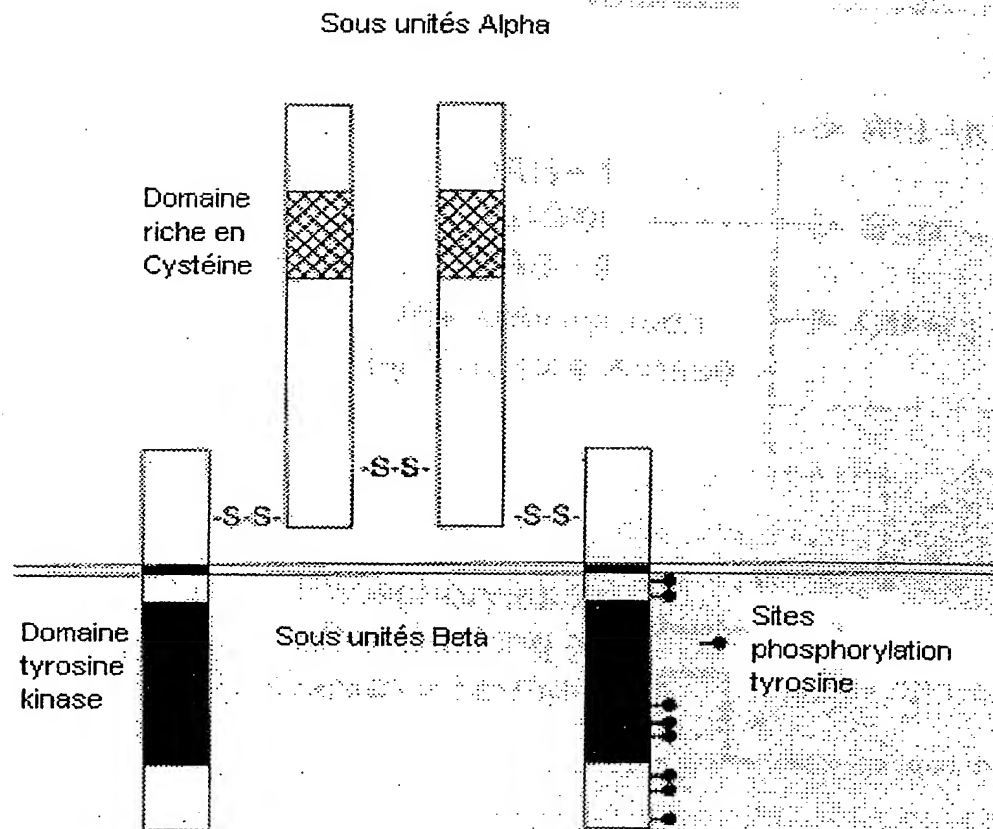


FIGURE 1

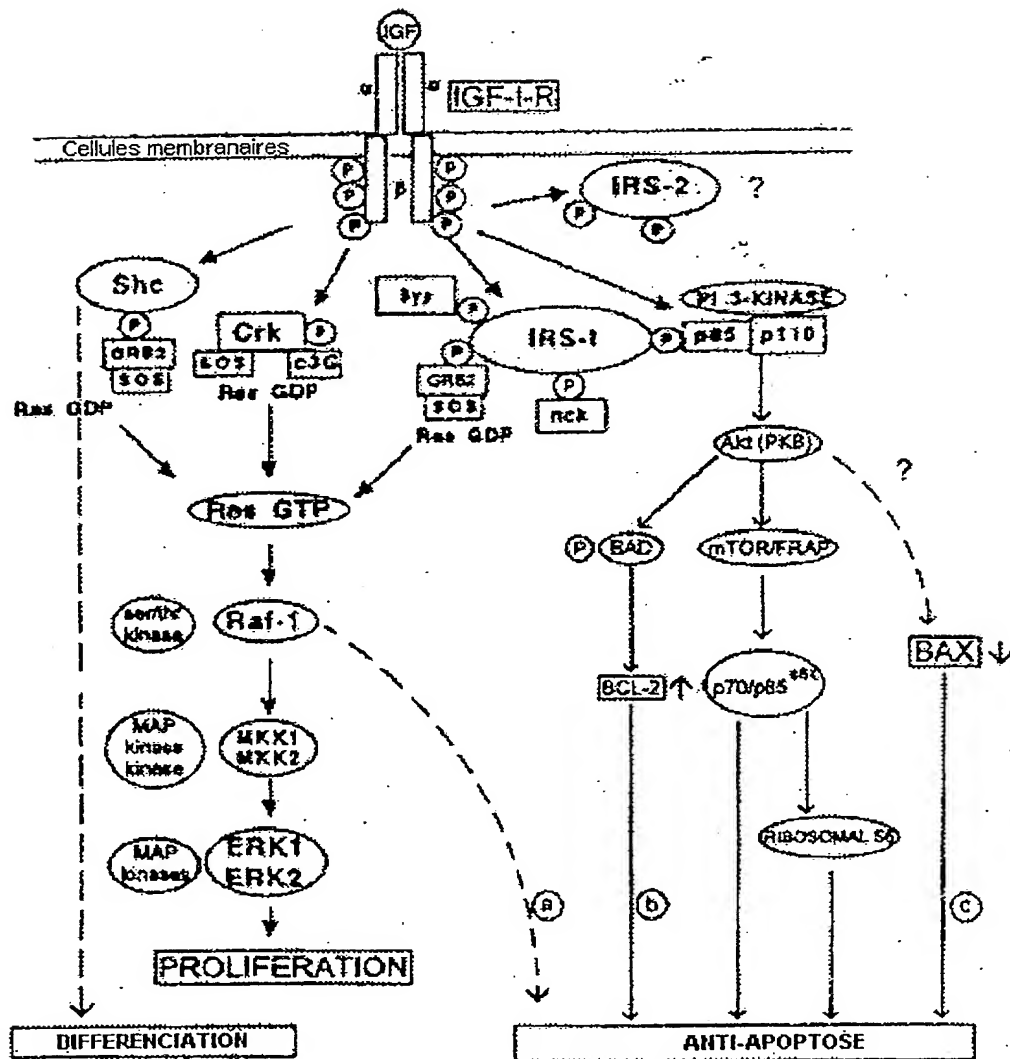


FIGURE 2

3/24

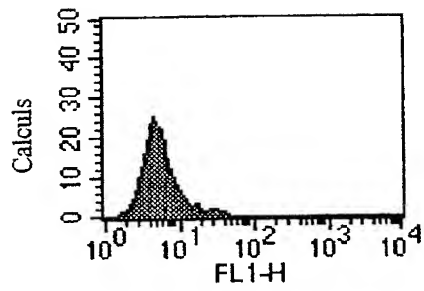


FIGURE 3A

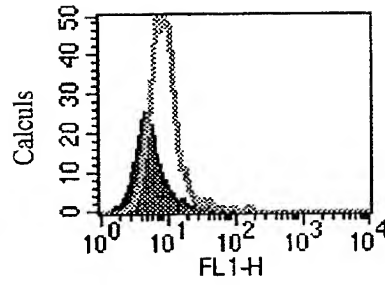


FIGURE 3B

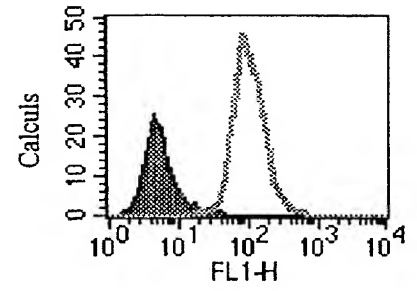
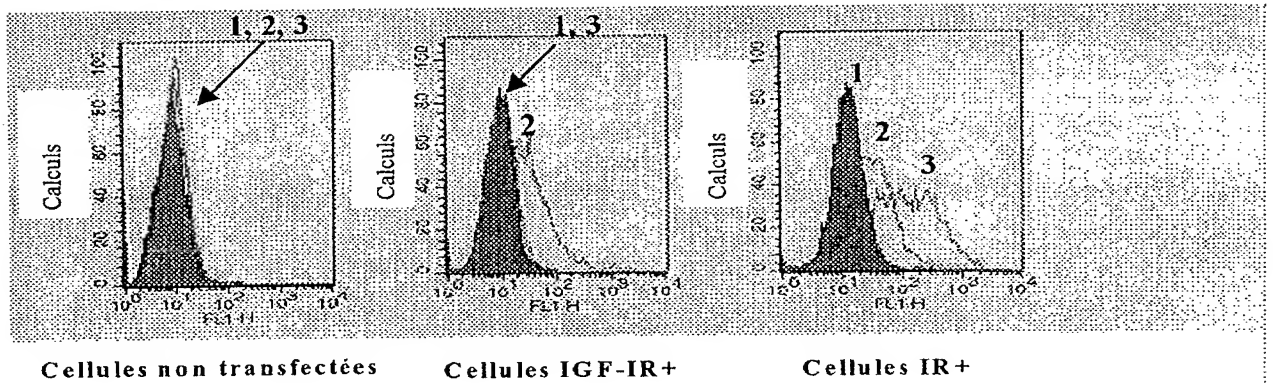


FIGURE 3C



Cellules non transfectées

Cellules IGF-IR+

Cellules IR+

FIGURE 4A

FIGURE 4B

FIGURE 4C

4/24

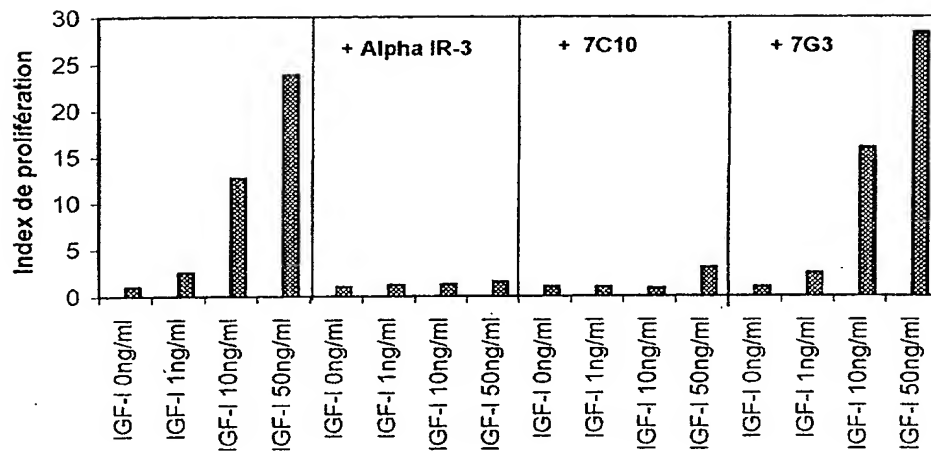


FIGURE 5

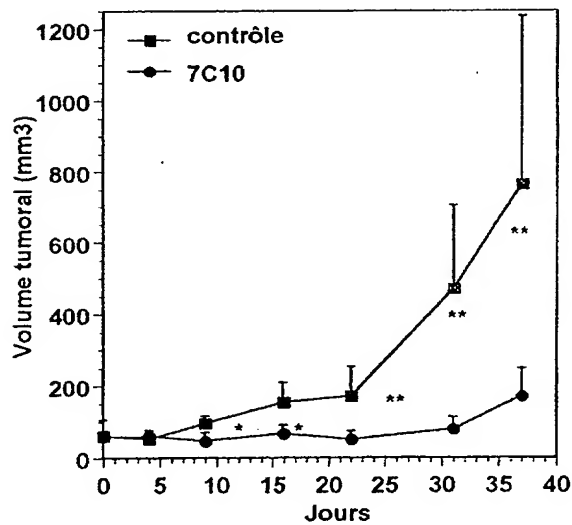


FIGURE 6A

5/24

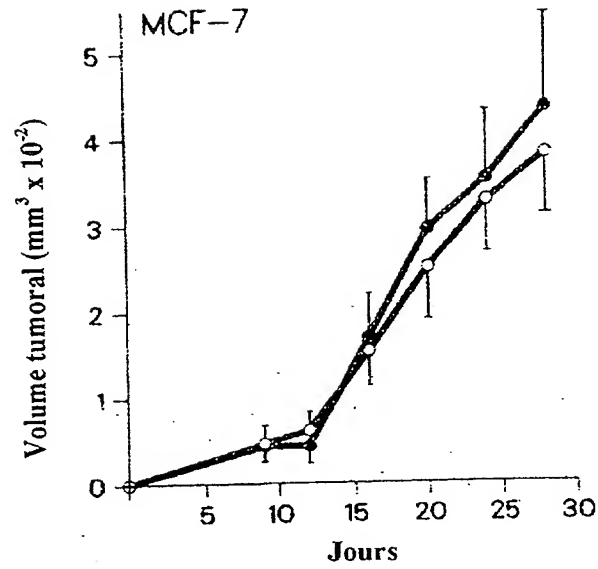


FIGURE 6B

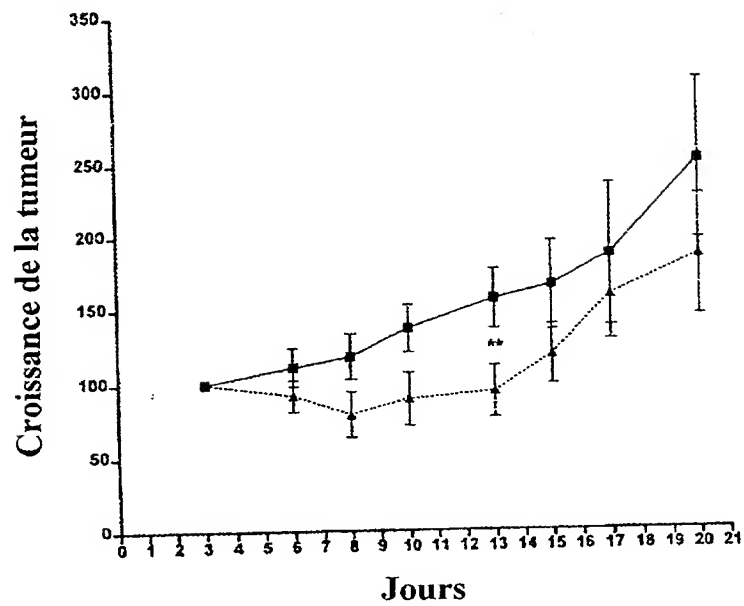


FIGURE 6C

6/24

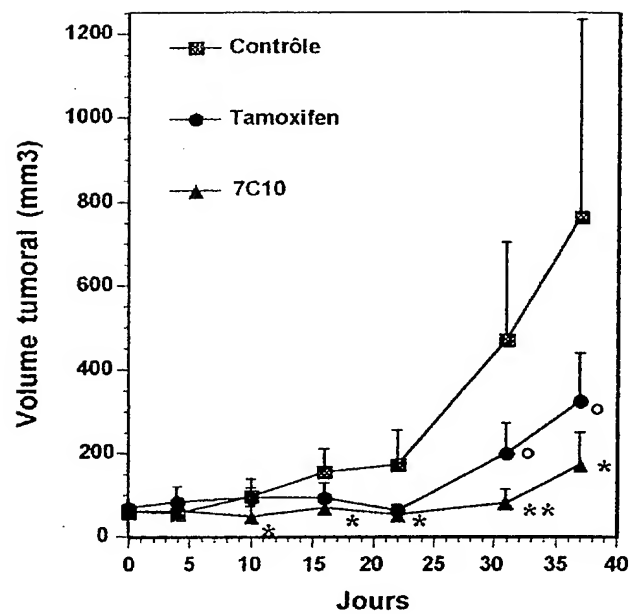


FIGURE 7

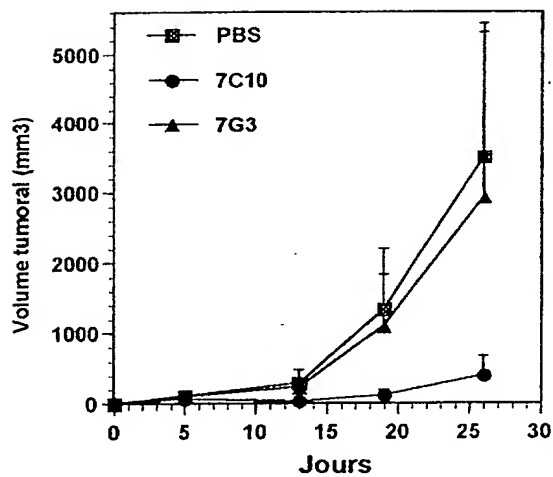


FIGURE 8A

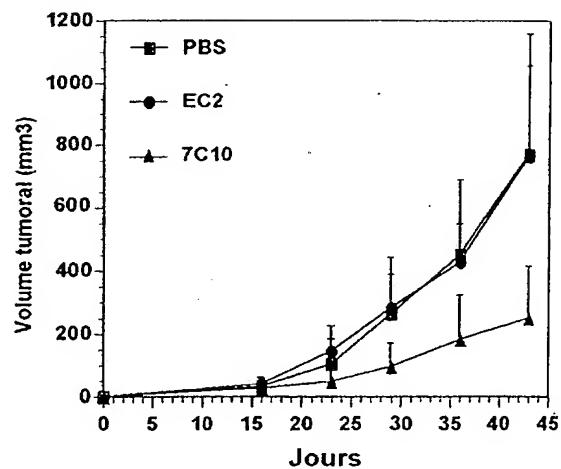


FIGURE 8B

7/24

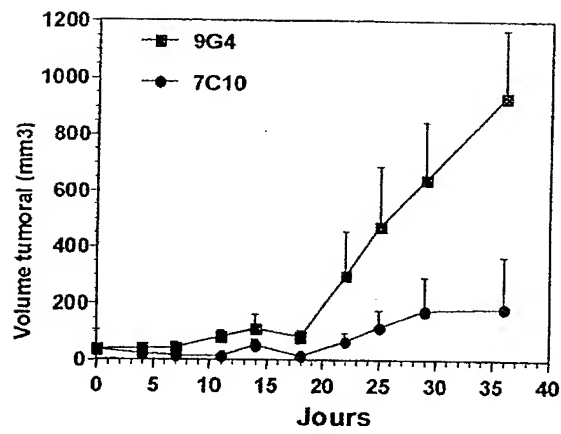


FIGURE 8C

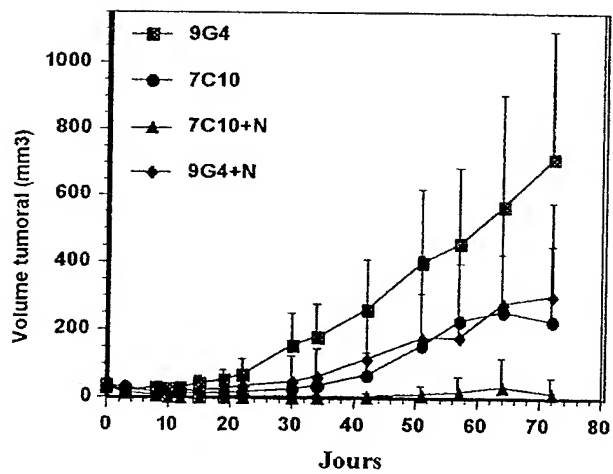


FIGURE 9

8/24

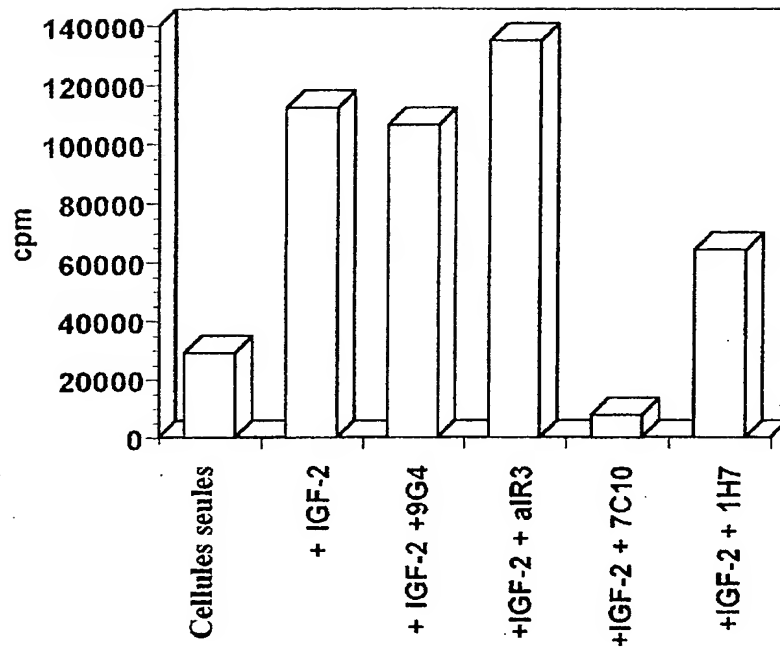


FIGURE 10

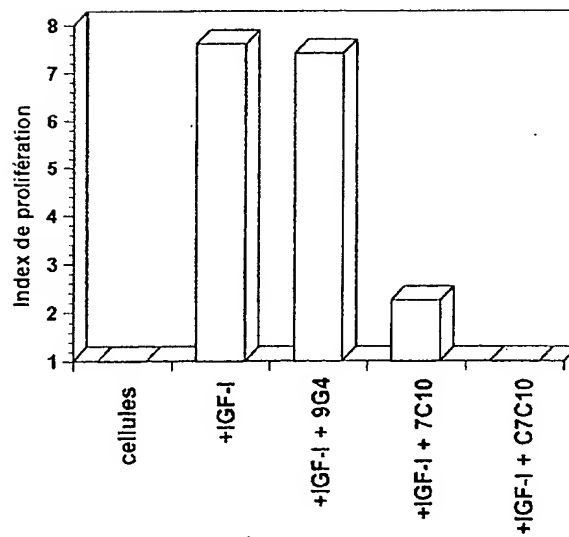


FIGURE 11

9/24

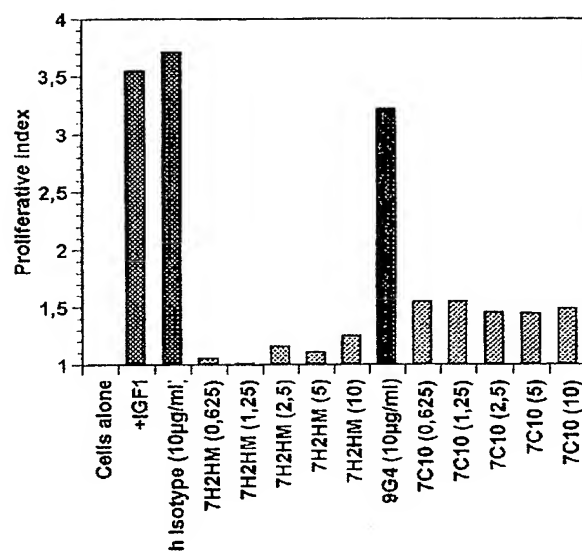


FIGURE 12

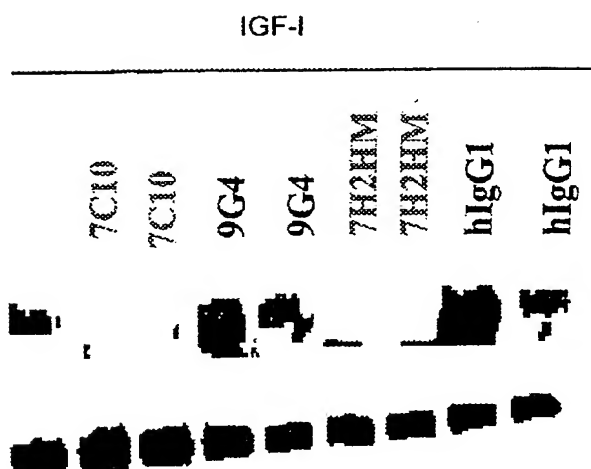


FIGURE 13

10/24

```

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCCTGCTTCCAGAAGTGAT
1  -----+-----+-----+-----+-----+ 60
TACTTCAACGGACAATCCGACAACCACGACTACAAGACCTAAGGACGAAGGTCTTCACTA
ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT
      oligo MKV-1      L M F W I P A S R S D -
                        extrémité 3' peptide leader
GTTTTGATGACCCAAATTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATC
61  -----+-----+-----+-----+-----+ 120
CAAAACTACTGGGTTTAAGGTGAGAGGGACGGACAGTCAGAACCTCTAGTTCGGAGGTAG

V L M T Q I P L S L P V S L G D Q A S I -
TCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTACAATGGTAC
121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
AGAACGTCTAGATCAGTCTCGTAACATGTATCATTACCTTTGTGGATAAATGTTACCATG

S C R S S Q S I V H S N G N T Y L Q W Y -
                        CDR 1
CTGCAGAAACCAGGTCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGACTTTAT
181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
GACGTCTTTGGTCCAGTCAGAGGTTTCGAGGACTAGATGTTTCAAAGGTTGGCTGAAATA

L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R L Y -
                        CDR 2
GGGGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGC
241 -----+-----+-----+-----+-----+ 300
CCCCAGGGTCTGTCCAAGTCACCGTCACCTAGTCCCTGTCTAAAGTGTGAGTTCTAGTCG

G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S -
AGCGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGTGG
301 -----+-----+-----+-----+-----+ 360
TCGCACCTCCGACTCCTAGACCCTCAAATAATGACGAAAGTTCCAAGTGTACAAGGCACC

S V E A E D L G V Y Y C F Q G S H V P W -
                        CDR 3
                        GG
ACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCC
361 -----+-----+-----+-----+-----+ 420
TGCAAGCCACCTCCGTGGTTCGACCTTTAGTTTGCCCGACTACGACGTGGTTGACATAGG

T F G G G T K L E I K

      MKC oligo
TAGAAGGGTGGTAGGTCA
ATCTTCCCACCATCCAGT
421 -----+-----+-----+-----+ 438
TAGAAGGGTGGTAGGTCA

```

FIGURE 14

ORNET REGIMBEAU

ORIGINAL

11/24

ATGATGGTGTAAAGTCTTCTGTACCTCTTGACAGCCATTCCCTGGTATCCTGTCTGATGTA
 1 -----+-----+-----+-----+-----+ 60
 TACTACCACAATTCAGAAGACATGGACAACCTGTCGGTAAGGACCATAGGACAGACTACAT
 MHV-12 ATGATGGTGTAAAGTCTTCTGTACCT
 MHV-8 ATGAGAGTGCTGATTCTTTTGTG

L L T A I P G I L S D V -
extrémité 3' peptide leader

CAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGGCCTCGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCTCTCACCTGC
 61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
 GTCGAAGTCCTCAGTCCTGGACCGGAGCACTTTGGAAGAGTCAGAGACAGAGAGTGGACG

Q L Q E S G P G L V K P S Q S L S L T C -
 TCTGTCAACGGCTACTCCATCACCGGTGGTTATTTATGGAACCTGGATCCGGCAGTTTCCA
 121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
 AGACAGTGGCCGATGAGGTAGTGGCCACCAATAAATACCTTGACCTAGGCCGTCAAAGGT

S V T G Y S I T G G Y L W N W I R Q F P -
 CDR 1
 GGAAACAACTGGAGTGGATGGGCTACATAAGCTACGACGGTACCAATAACTACAAACCA
 181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
 CCTTTGTTTGACCTCACCTACCCGATGTATTTCGATGCTGCCATGGTTATTGATGTTTGGT

G N K L E W M G Y I S Y D G T N N Y K P -
 CDR 2
 TCTCTCAAAGATCGAATCTCCATCACTCGTGACACATCTAAGAACCAGTTTTTCCTGAAG
 241 -----+-----+-----+-----+-----+ 300
 AGAGAGTTTCTAGCTTAGAGGTAGTGAGCACTGTGTAGATTCTTGGTCAAAAAGGACTTC

S L K D R I S I T R D T S K N Q F F L K -
 TTGAATTCTGTGACTAATGAAGACACAGCTACATATTACTGTGCAAGATACGGTAGGGTC
 301 -----+-----+-----+-----+-----+ 360
 AACTTAAGACACTGATTACTTCTGTGTGCGATGTATAATGACACGTTCTATGCCATCCCAG

L N S V T N E D T A T Y Y C A R Y G R V -
 CDR 3
 TTCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACGACACCC
 361 -----+-----+-----+-----+-----+ 420
 AAGAACTGATGACCCCGGTTCCGTGGTGAGAGTGTGAGAGGAGTCGGTTTGTCTGTGGG

F F D Y W G Q G T T L T V S S
 oligo MHC-1
 GGTAGACAGATAGGTGAC
 CCATCTGTCTATCCACTG
 421 -----+-----+-----+-----+ 438
 GGTAGACAGATAGGTGAC

FIGURE 15

GABINET REGIMBEAU

ORIGINAL

12/24

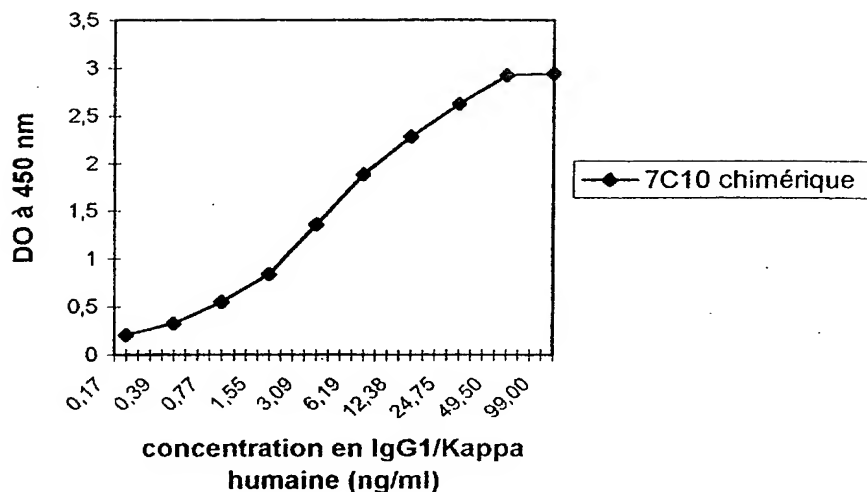


FIGURE 16

	3	7		CDR 1
7C10 VL souris	DVL	MTQ	IPLSLPVSLGDQASISC	RSSQSIVHSNGNTYLQ
DRB1-4.3	T.....E
C94-5B11'CL	T.....E
Kabat sgII souris	..V..	..T..L.....E
CDR 2				
7C10 VL souris	WYLQKPGQSPKLLIY	KVSNRLY	GVPDRFSGSGSGTDFTL	
DRB1-4.3FS	
C94-5B11'CLFS	
Kabat sgII sourisFS	
CDR 3				
7C10 VL souris	KISSVEAEDLGVIYC	FQGSHPWT	FGGGTKLEIK	
DRB1-4.3	...R.....F.	..S....D..	
C94-5B11'CL	...R.....	
Kabat sgII souris	...R.....	...T...Y.	

FIGURE 17



13/24

CDR 1

7C10 VL souris	DVLMTQIPLSLPVSLGDQASISC	<u>RSSQSIVHSNGNTYLQ</u>
GM607	.IV...S.....TP.EP.....LL....YN..D
DPK15/A19	.IV...S.....TP.EP.....LL....YN..D
Kabat sgII hu	.IV...S.....TP.EP.....LL..D.XX..X

CDR 2

7C10 VL souris	WYLQKPGQSPKLLIY	<u>KVSNRLY</u>	GVPDRFSGSGSGTDFTLK
GM607Q....	LG...AS
DPK15/A19Q....	LG...AS
Kabat sgII huQ....	L....AS

CDR 3

7C10 VL souris	ISSVEAEDLGVIYC	<u>FGGSHVPWT</u>	FGGGTKLEIK
GM607	..R.....V.....	M.ALQT.Q.	..Q...V...
DPK15/A19	..R.....V.....	M.ALQT.	
Kabat sgII hu	..R.....V.....	M.ALQX.R.	..Q...V...

FIGURE 18

CDR 1

7C10 VL souris	DVLMTQIPLSLPVSLGDQASISC	<u>RSSQSIVHSNGNTYLQ</u>
GM 607	.IV...S.....TP.EP.....LL....YN..D
7C10 VL Humanisée 1	..V...S.....TP.EP.....
7C10 VL Humanisée 2	.IV...S.....TP.EP.....

CDR 2

7C10 VL souris	WYLQKPGQSPKLLIY	<u>KVSNRLY</u>	GVPDRFSGSGSGTDFTL
GM 607Q....	LG...AS
7C10 VL Humanisée 1Q....	
7C10 VL Humanisée 2Q....	

CDR 3

7C10 VL souris	KISSVEAEDLGVIYC	<u>FGGSHVPWT</u>	FGGGTKLEIK
GM 607	...R.....V.....	M.ALQT.Q.	..Q...V...
7C10 VL Humanisée 1	...R.....V.....		..Q...V...
7C10 VL Humanisée 2	...R.....V.....		..Q...V...

FIGURE 19

GAGNET REGIMBEAU

ORIGINAL

14/24

MluI
|
GTCAGAACGCGTGCCGCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGG
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
CAGTCTTGCGCACGGCGGTGGTACTTCAACGGACAATCCGACAACCACGACTACAAGACC

M K L P V R L L V L M F W -
Peptide leader
TTTCCTGCTTCCAGCAGTGATGTTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACC
61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
AAAGGACGAAGGTCGTCATAAACAATACTGAGTCAGAGGTGAGAGGGACGGGCAGTGG

2
F P A S S S D V V M T Q S P L S L P V T -
CCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGA
121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
GGACCTCTCGGCCGGAGGTAGAGGACGTCCAGATCAGTCTCGTAACATGTATCATTACCT

CDR 1
P G E P A S I S C R S S Q S I V H S N G -
KpnI
|
AACACCTATTTGCAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT
181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
TTGTGGATAAACGTTACCATGGACGTCTTCGGTCCCGTCAGAGGTGTCGAGGACTAGATA

N T Y L Q W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y -
AAAGTTTCTAATCGGCTTTATGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGCACA
241 -----+-----+-----+-----+-----+ 300
TTTCAAAGATTAGCCGAAATACCCAGGGACTGTCCAAGTCACCGTCACCTAGTCCGTGT

CDR 2
K V S N R L Y G V P D R F S G S G S G T -
GATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCTTT
301 -----+-----+-----+-----+-----+ 360
CTAAAATGTGACTTTTAGTCGTCTCACCTCCGACTCCTACAACCCCAAATAATGACGAAA

D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F -
CAAGGTTACATGTTCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGTGAG
361 -----+-----+-----+-----+-----+ 420
GTTCCAAGTGTAAGAAGCACCTGCAAGCCGGTTCCCTGGTTCCACCTTTAGTTTGCACTC

CDR 3
Q G S H V P W T F G Q G T K V E I K
BamHI
|
TGGATCCTCTGCG
421 -----+----- 433
ACCTAGGAGACGC

FIGURE 20

CAGNET REGIMBEAU

ORIGINAL

15/24

MluI
 |
 GTCAGAACGCGTGCCGCCACCATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGG
 1 -----+-----+-----+-----+-----+ 60
 CAGTCTTGCGCACGGCGGTGGTACTTCAACGGACAATCCGACAACCACGACTACAAGACC

M K L P V R L L V L M F W -
 Peptide leader

TTTCCTGCTTCCAGCAGTGATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACC
 61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
 AAAGGACGAAGGTCGTCACTACAACACTACTGAGTCAGAGGTGAGAGGGACGGGCAGTGG

2
 F P A S S S D I V M T Q S P L S L P V T -

CCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCTGTCAGGTCTAGTCAGAGCATTGTACATAGTAATGGA
 121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
 GGACCTCTCGGCCGGAGGTAGAGGACGTCCAGATCAGTCTCGTAACATGTATCATTACCT

CDR 1

P G E P A S I S C R S S Q S I V H S N G -

KpnI
 |

AACACCTATTTGCAATGGTACCTGCAGAAGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTAT
 181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
 TTGTGGATAAACGTTACCATGGACGTCTTCGGTCCCGTCAGAGGTGTCGAGGACTAGATA

N T Y L Q W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y -

AAAGTTTCTAATCGGCTTTATGGGGTCCCTGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACA
 241 -----+-----+-----+-----+-----+ 300
 TTTCAAAGATTAGCCGAAATACCCCAGGGACTGTCCAAGTCACCGTCACCTAGTCCGTGT

CDR 2

K V S N R L Y G V P D R F S G S G S G T -

GATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCTTT
 301 -----+-----+-----+-----+-----+ 360
 CTAAATGTGACTTTTAGTCGTCTCACCTCCGACTCCTACAACCCCAAATAATGACGAAA

D F T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F -

CAAGGTTTCACATGTTCCGTGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTGAG
 361 -----+-----+-----+-----+-----+ 420
 GTTCCAAGTGTACAAGGCACCTGCAAGCCGGTTCCTGGTTCCACCTTTAGTTTGCACCTC

CDR 3

Q G S H V P W T F G Q G T K V E I K

BamHI
 |
 TGGATCCTCTGCG
 421 -----+----- 433
 ACCTAGGAGACGC

FIGURE 21

CABINET REGIMBEAU

ORIGINAL

16/24

	17	27	CDR 1
7C10 VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSIT		GGYLWN WIRQ
AN03' CL		S..Y.. ..
Kabat sgI(A)	<u>E</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>D</u> ...		S..WN. ...

	CDR 2
7C10 VH	FPGNKLEWMG YISYDGTNNYKPSLKD RISITRDTSKNQFFL
AN03' CLN...N...N...N
Kabat sgI(A)S.STY.N....SY...

	84	CDR 3
7C10 VH	KLNSVTNEDTATYYCAR	YGRV-FFDY WGQGTTTLTVSS
AN03' CLT.....	E.YGY.....
Kabat sgI(A)	<u>Q</u> <u>T</u>	G.YGYG... ..V....

FIGURE 22

	Rch 1	30	CDR 1	Rch 2
7C10 VH souris	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSIT		GGYLWN WIRQ	
human Kabat sgII	Q.....T.....T.S. <u>G</u> . <u>V</u> S		SYWS.. ..	
human VH FUR1' CL	Q.....ET.....T.S....S		S..Y.S ..	
human Germ-line	Q.....ET.....T.S....S		S..Y.S ..	
	Rch 2 48	CDR 2	67 71	Rch 3
7C10 VH souris	FPGNKLEWMG	YISYDGTNNYKPSLKD		RISITRDTSKNQFFL
human Kabat sgII	P..KG...I.	R.Y.S.STX.N....S		.VT.SV.....S.
human VH FUR1' CL	P..KG...I.	SMEHS.SSY.N....S		.VT.SV.....S.
human Germ-line	P..KG...I.	S.YHS.STY.N....S		.VT.SV.....S.
	Rch 3	CDR 3		Rch 4
7C10 VH souris	KLNSVTNEDTATYYCAR	YGRVFFDY		WGQGTTTLTVSS
human Kabat sgII	..S...AA...V.....	ELPGGYDV	LV....
human VH FUR1' CL	Q.R...AA...V.....	GRYCSSTSCNWEDP	LV....
human Germ-line	..S...AA...V.....			

FIGURE 23

CABINET REGIMDEAU

ORIGINAL

17/24

		30	CDR 1	48
7C10 VH souris	DVQLQESGPGGLVKPSQSLSLTCSVTGYSIT	<u>T</u>	<u>GGYLWN</u>	WIRQFPGNKLEWMG
human germline	Q.....ET.....T.S.....	<u>S</u>	<u>S..Y.G</u>P..KG... <u>I</u> .
VH Humanisé 1	Q.....ET.....T.S.....		P..KG.....
VH Humanisé 2	Q.....ET.....T.S.....		P..KG... <u>I</u> .
VH Humanisé 3	Q.....ET.....T.S.....	<u>S</u>	P..KG... <u>I</u> .

	CDR 2	67	71
7C10 VH souris	<u>YISYDGTNNYKPSLKD</u>	RISITR	DTSKNQFFLKLNSVTNEDTATYYCAR
human germline	<u>S.FHS.SSY.N....S</u>	<u>.VT.SV</u>S...S...AA...V.....
VH Humanisé 1	<u>.T.S</u>S...S...AA...V.....
VH Humanisé 2	<u>.VT.S</u>S...S...AA...V.....
VH Humanisé 3	<u>.VT.SV</u>S...S...AA...V.....

	CDR 3
7C10 VH souris	<u>YGRVFFDY</u> WGQGTTLTVSS
human germline	
VH Humanisé 1LV.....
VH Humanisé 2LV.....
VH Humanisé 3LV.....

FIGURE 24

CABINET REGIMBEAU

ORIGINAL

18/24

MluI

```

      |
GTCAGAACGCGTGCCGCCACCATGAAAGTGTTGAGTCTGTTGTACCTCTTGACAGCCATT
1  -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
CAGTCTTGCGCACGGCGGTGGTACTTTTCAAACTCAGACAACATGGAGAACTGTGCGTAA

      M K V L S L L Y L L T A I -
      Peptide leader
CCTGGTATCCTGTCTCAGGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG
61  -----+-----+-----+-----+-----+ 120
GGACCATAGGACAGAGTCCACGTCTGAAGTCTCAGCCCCGGTCTGACCACTTCGGAAGC

      P G I L S Q V Q L Q E S G P G L V K P S -
GAGACCCTGTCCCTCACCTGCAGTGTCTCTGGTTACTCCATCACCGGTGGTTATTTATGG
121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
CTCTGGGACAGGGAGTGGACGTGACAGAGACCAATGAGGTAGTGGCCACCAATAAATACC

      E T L S L T C T V S G Y S I T G G Y L W -
      30 CDR 1
AACTGGATACGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATGGGGTATATCAGCTACGAC
181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
TTGACCTATGCCGTCGGGGGTCCCTTCCCTGACCTCACCTACCCCATATAGTCGATGCTG

      N W I R Q P P G K G L E W M G Y I S Y D -
      48 KpnI
      |
GGTACCAATAACTACAAACCCCTCCCTCAAGGATCGAATCACCATATCACGTGACACGTCC
241 -----+-----+-----+-----+-----+ 300
CCATGGTTATTGATGTTTGGGAGGGAGTTCCTAGCTTAGTGGTATAGTGCAGTGTGCAGG

      G T N N Y K P S L K D R I T I S R D T S -
      CDR 2 67 71
AAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACTGCAGTGTATTAC
301 -----+-----+-----+-----+-----+ 360
TTCTTGGTCAAGAGGGACTTCGACTCGAGACACTGGCGACGCCTGTGACGTACATAATG

      K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y -
TGTGCGAGATACGGTAGGGTCTTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
361 -----+-----+-----+-----+-----+ 420
ACACGCTCTATGCCATCCCAGAAGAACTGATGACCCCGGTCCCTTGGGACCACTGGGCAG

      C A R Y G R V F F D Y W G Q G T L V T V -
      CDR 3
      BamHI
      |
TCCTCAGGTGAGTGGATCCTCTGCG
421 -----+-----+-----+ 445
AGGAGTCCACTCACCTAGGAGACGC

      S S -

```

CABINET REGIMBEAU
ORIGINAL

FIGURE 25

MluI
|
GTCAGAACGCGTGCCGCCACCATGAAAGTGTTGAGTCTGTTGTACCTCTTGACAGCCATT
1 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 60
CAGTCTTGCGCACGGCGGTGGTACTTTTCACTCAGACAACATGGAGAACTGTCGGTAA

M K V L S L L Y L L T A I -
Peptide leader
CCTGGTATCCTGTCTCAGGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG
61 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 120
GGACCATAGGACAGAGTCCACGTGCAAGTCCTCAGCCCGGTCTTGACCACTTCGGAAGC

P G I L S Q V Q L Q E S G P G L V K P S -
GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTTACTCCATCACCGGTGGTTATTTATGG
121 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 180
CTCTGGGACAGGGAGTGGACGTGACAGAGACCAATGAGGTAGTCGCCACCAATAAATACC

E T L S L T C T V S G Y S I T G G Y L W -
30 CDR 1
AACTGGATACGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATCGGGTATATCAGCTACGAC
181 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 240
TTGACCTATGCCGTGCGGGGTCCCTTCCCTGACCTACCTAGCCCATATAGTCGATGCTG

N W I R Q P P G K G L E W I G Y I S Y D -
48

KpnI
|
GGTACCAATAACTACAAACCCTCCCTCAAGGATCGAGTCACCATATCACGTGACACGTCC
241 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 300
CCATGGTTATTGATGTTTGGGAGGGAGTTCCTAGCTCAGTGGTATAGTGCAGTGTGCAGG

G T N N Y K P S L K D R V T I S R D T S -
CDR 2 67 71
AAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACTGCAGTGTATTAC
301 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 360
TTCTTGGTCAAGAGGGACTTCGACTCGAGACACTGGCGACGCCTGTGACGTACATAATG

K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y -
TGTGCGAGATACGGTAGGGTCTTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
361 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 420
ACACGCTCTATGCCATCCCAGAAGAACTGATGACCCCGGTCCCTTGGGACCACTGGCAG

C A R Y G R V F F D Y W G Q G T L V T V -
CDR 3

BamHI
|
TCCTCAGGTGAGTGGATCCTCTGCG
421 -----+-----+-----+-----+-----+ 445
AGGAGTCCACTCACCTAGGAGACGC

S S -

FIGURE 26

ARNET REGIMBEAU
ORIGINAL

20/24

MluI
|
GTCAGAACGCGTGCCGCCACCATGAAAGTGTTGAGTCTGTTGTACCTCTTGACAGCCATT
1 -----+-----+-----+-----+-----+ 60
CAGTCTTGCGCACGGCGGTGGTACTTTTCACTCAGACAACATGGAGAACTGTCGGTAA

M K V L S L L Y L L T A I -
Peptide leader
CCTGGTATCCTGTCTCAGGTGCAGCTTCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCG
61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
GGACCATAGGACAGAGTCCACGTCGAAGTCCTCAGCCCGGGTCTGACCACTTCGGAAGC

P G I L S Q V Q L Q E S G P G L V K P S -
GAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTTACTCCATCAGCGGTGGTTATTTATGG
121 -----+-----+-----+-----+-----+ 180
CTCTGGGACAGGGAGTGGACGTGACAGAGACCAATGAGGTAGTCGCCACCAATAAATACC

E T L S L T C T V S G Y S I S G G Y L W -
30 CDR 1
AACTGGATACGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATCGGGTATATCAGCTACGAC
181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
TTGACCTATGCGGTCGGGGGTCCCTTCCCTGACCTCACCTAGCCCATATAGTCGATGCTG

N W I R Q P P G K G L E W I G Y I S Y D -
48
KpnI
|
GGTACCAATAACTACAAACCCTCCCTCAAGGATCGAGTCACCATATCAGTGGACACGTCC
241 -----+-----+-----+-----+-----+ 300
CCATGGTTATTGATGTTTGGGAGGGAGTTCTAGCTCAGTGGTATAGTCACCTGTGCAGG

G T N N Y K P S L K D R V T I S V D T S -
67 71
AAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCTGCGGACACTGCAGTGTATTAC
301 -----+-----+-----+-----+-----+ 360
TTCTTGGTCAAGAGGGACTTCGACTCGAGACACTGGCGACGCCTGTGACGTACATAATG

K N Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y -
TGTGCGAGATACGGTAGGGTCTTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTC
361 -----+-----+-----+-----+-----+ 420
ACACGCTCTATGCCATCCCAGAAGAACTGATGACCCCGGTCCCTTGGGACCACTGGGCAG

C A R Y G R V F D Y W G Q G T L V T V -
CDR 3
BamHI
|
TCCTCAGGTGAGTGGATCCTCTGCG
421 -----+-----+-----+-----+ 445
AGGAGTCCACTCACCTAGGAGACGC

S S

FIGURE 27

JEAN-PIERRE REGIMBEAU
ORIGINAL

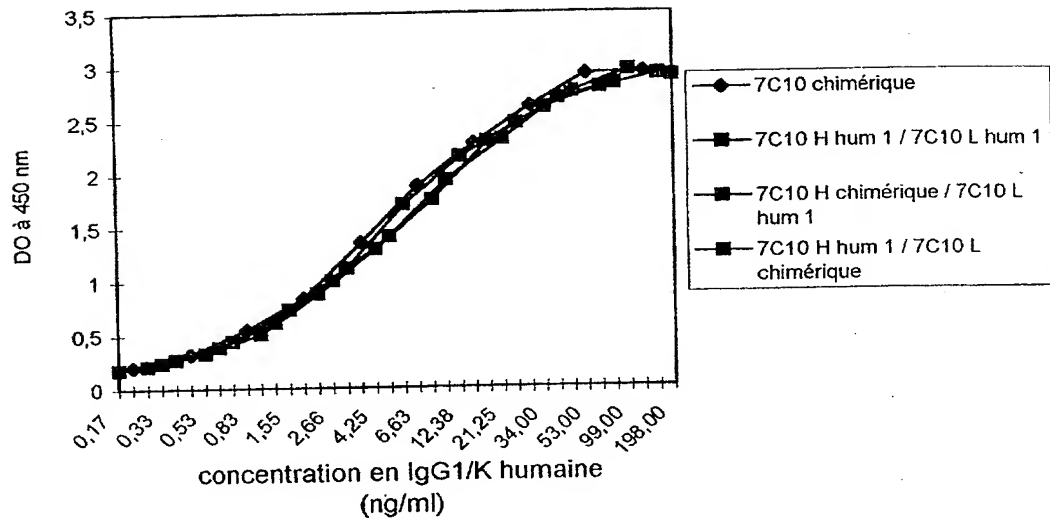


FIGURE 28

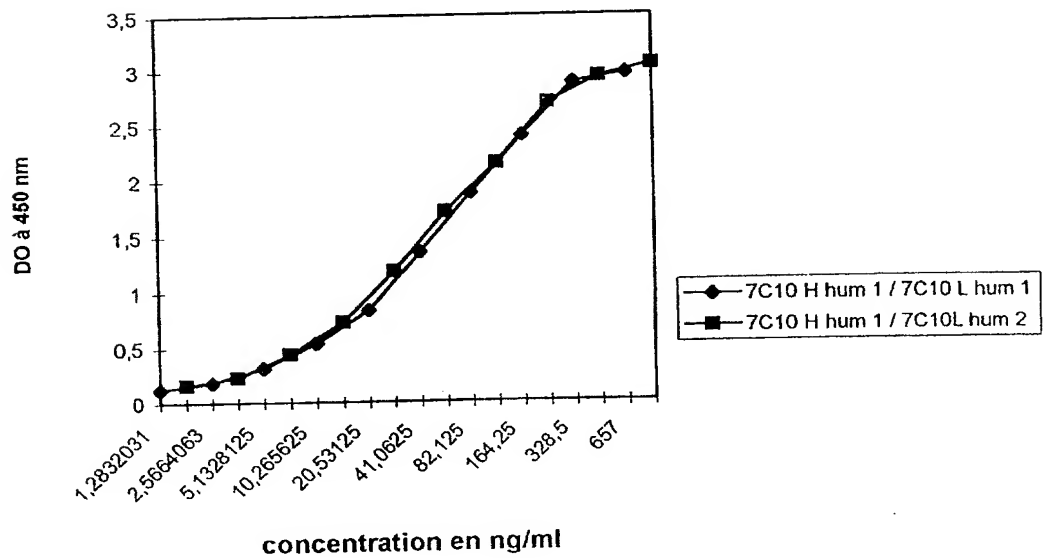


FIGURE 29

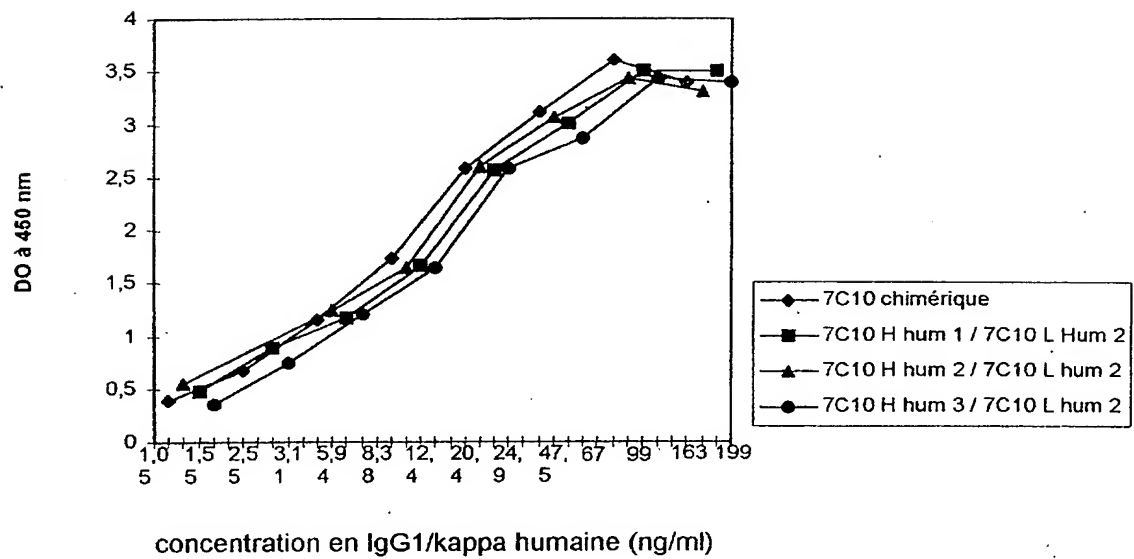


FIGURE 30



23/24

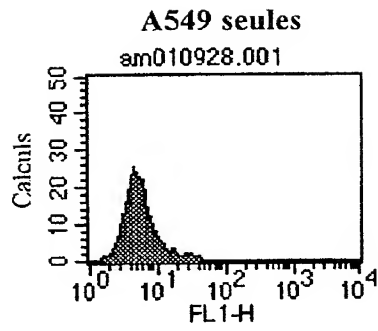


FIGURE 31A

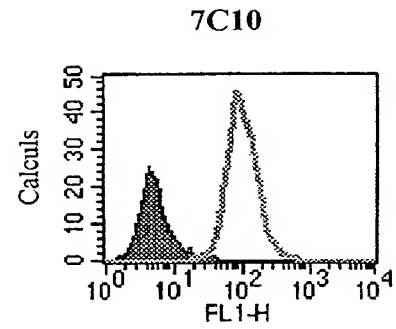


FIGURE 31B

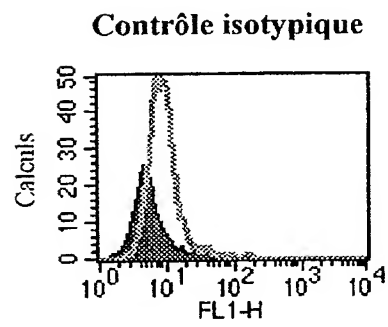


FIGURE 31C

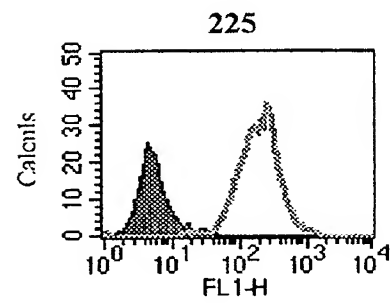


FIGURE 31D

VERMET REGIMBEAU
ORIGINAL

24/24

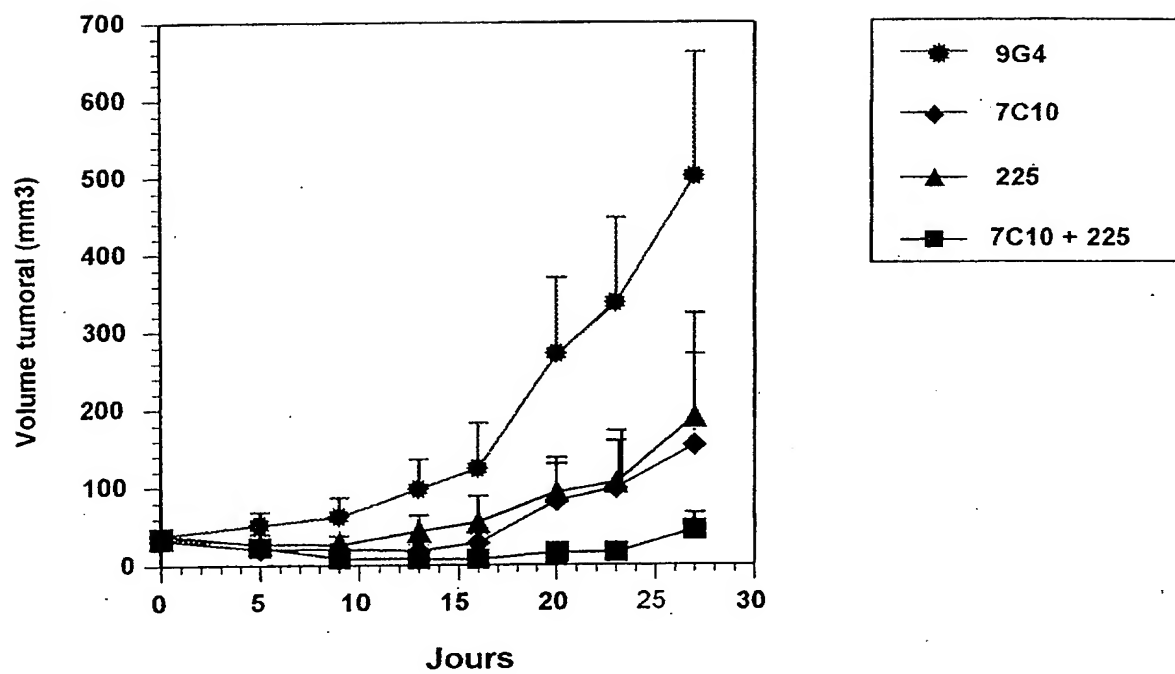


FIGURE 32

LISTE DE SEQUENCES

<110> Pierre Fabre Médicament

<120> Nouvelles compositions à activité anti-IGF-IR et anti-EGFR
et leurs applications

<130> D19927

<160> 156

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 48

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(48)

<400> 1

aga	tct	agt	cag	agc	att	gta	cat	agt	aat	gga	aac	acc	tat	tta	caa	48
Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Gln	
1				5					10					15		

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Gln
1				5					10					15	

<210> 3

<211> 21

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(21)

<400> 3

aaa	gtt	tcc	aac	cga	ctt	tat	21
Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Leu	Tyr	
1				5			

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Leu	Tyr
1				5		

<210> 5
<211> 27
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(27)

<400> 5
ttt caa ggt tca cat gtt ccg tgg acg
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr
1 5

27

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 7
<211> 18
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(18)

<400> 7
ggt ggt tat tta tgg aac
Gly Gly Tyr Leu Trp Asn
1 5

18

<210> 8
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 8
Gly Gly Tyr Leu Trp Asn
1 5

<210> 9
<211> 48
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(48)

<400> 9

tac ata agc tac gac ggt acc aat aac tac aaa cca tct ctc aaa gat 48
 Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp
 1 5 10 15

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 10

Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp
 1 5 10 15

<210> 11

<211> 24

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(24)

<400> 11

tac ggt agg gtc ttc ttt gac tac 24
 Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 13

<211> 26

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 13

atgaaatgca gctgggtcat sttctt 26

<210> 14

<211> 26

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 14

atgggatgga gctrtatcat sytctt 26

<210> 15

<211> 26

<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 15
atgaagwtgt ggttaaactg ggTTTT 26

<210> 16
<211> 23
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 16
atgractttg ggytcagctt grt 23

<210> 17
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 17
atggactcca ggctcaattt agTTTT 26

<210> 18
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 18
atggctgtcy trsgcttctt cttctg 26

<210> 19
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 19
atggratgga gckggrtctt tmtctt 26

<210> 20
<211> 23
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 20
atgagagtgc tgattctttt gtg 23

<210> 21
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 21
atggmttggg tgtggamctt gctatt 26



<210> 22
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 22
atgggcagac ttacattctc attcct 26

<210> 23
<211> 28
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 23
atggattttg ggctgatttt ttttattg 28

<210> 24
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 24
atgatggtgt taagtcttct gtacct 26

<210> 25
<211> 29
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 25
atgaagttgc ctgtaggct gttggtgct 29

<210> 26
<211> 29
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 26
atggagwcag acacactcct gytatgggt 29

<210> 27
<211> 23
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 27
atgagtgtgc tcaactcaggt cct 23

<210> 28
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 28
atgaggcccc ctgctcagwt tyttgg 26

<210> 29
<211> 29
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 29
atggatttwc aggtgcagat twtcagctt 29

<210> 30
<211> 29
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 30
atggatttwc argtgcagat twtcagctt 29

<210> 31
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 31
atgaggtkcy ytgytsagyt yctgrg 26

<210> 32
<211> 23
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 32
atgggcwtca agatggagtc aca 23

<210> 33
<211> 29
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 33
atgtggggay ctktttycmm tttttcaat 29

<210> 34
<211> 24
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 34
atggtrtccw casctcagtt cctt 24

<210> 35
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus



<400> 35
atgtatatat gtttgttgtc tatttc 26

<210> 36
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 36
atggaagccc cagctcagct tctctt 26

<210> 37
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 37
atgragtywc agaccaggt cttyrt 26

<210> 38
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 38
atggagacac attctcaggt ctttgt 26

<210> 39
<211> 26
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 39
atggattcac aggcccaggt tcttat 26

<210> 40
<211> 20
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 40
actggatggt gggaagatgg 20

<210> 41
<211> 42
<212> ADN
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(42)

<400> 41
gct gat gct gca cca act gta tcc atc ttc cca cca tcc agt 42
Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser

```
<400> 42
Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser
  1             5             10
```

```
<400> 43
ccatcttccc accatccagt                20
```

```
<400> 44
ccagtggata gacagatg                                     18
```

```
<220>
<221> CDS
<222> (1) .. (33)
```

```
<400> 45
gcc aaa acg aca ccc cca tct gtc tat cca ctg
Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu
      1             5             10
```

<400> 46
Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu
1 5 10

```
<210> 47
<211> 21
<212> ADN
<213> Mus musculus
```

<400> 47

cccccatctg tctatccact g

21

<210> 48

<211> 438

<212> ADN

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (28)..(393)

<400> 48

atgaagttgc ctgtaggct gttggtg ctg atg ttc tgg att cct gct tcc aga 54

Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala Ser Arg

1

5

agt gat gtt ttg atg acc caa att cca ctc tcc ctg cct gtc agt ctt 102

Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu

10

15

20

25

gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agc att gta cat 150

Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His

30

35

40

agt aat gga aac acc tat tta caa tgg tac ctg cag aaa cca ggt cag 198

Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln

45

50

55

tct cca aag ctc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga ctt tat ggg gtc 246

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr Gly Val

60

65

70

cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca ctc aag 294

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys

75

80

85

atc agc agc gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat tac tgc ttt caa 342

Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln

90

95

100

105

ggg tca cat gtt ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc 390

Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

110

115

120

aaa cgg gctgatgctg caccaactgt atccatcttc ccaccatcca gt 438

Lys

<210> 49

<211> 122

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 49

Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala Ser Arg Ser Asp Val Leu Met Thr Gln

1

5

10

15

Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser

20

25

30

```
<210> 50
<211> 438
<212> ADN
<213> Mus musculus
```

<210> 51
<211> 438
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 51
atgatgggtgt taagtcttct gtac ctc ttg aca gcc att cct ggt atc ctg 51
Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ile Leu
1 5

cag tct ctg tct ctc acc tgc tct gtc acc ggc tac tcc atc acc ggt 147
Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Gly
30 35 40

ggt tat tta tgg aac tgg atc cgg cag .ttt cca gga aac aaa ctg gag 195
Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu

 45 50 55



tgg atg ggc tac ata agc tac gac ggt acc aat aac tac aaa cca tct 243
 Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser
 60 65 70

ctc aaa gat cga atc tcc atc act cgt gac aca tct aag aac cag ttt 291
 Leu Lys Asp Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 75 80 85

ttc ctg aag ttg aat tct gtg act aat gaa gac aca gct aca tat tac 339
 Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 90 95 100 105

tgt gca aga tac ggt agg gtc ttc ttt gac tac tgg ggc caa ggc acc 387
 Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 110 115 120

act ctc aca gtc tcc tca gccaaaaacga cccccccatc tgtctatcca ctg 438
 Thr Leu Thr Val Ser Ser
 125

<210> 52
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 52
 Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ile Leu Ser Asp Val Gln Leu Gln Glu
 1 5 10 15

Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys
 20 25 30

Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile
 35 40 45

Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr
 50 55 60

Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp Arg Ile Ser Ile
 65 70 75 80

Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu Lys Leu Asn Ser Val
 85 90 95

Thr Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val
 100 105 110

Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 53
 <211> 438
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

<400> 53
 tactaccaca attcagaaga catggacaac tgtcggtaag gaccatagga cagactacat 60


```

gtcgaagtcc tcagtcctgg accggagcac tttggaagag tcagagacag agagtggacg 120
agacagtggc cgatgaggta gtggccacca ataaatacct tgacctaggc cgtcaaaggt 180
cctttgtttg acctcaccta cccgatgtat tcgatgctgc catgggttatt gatgtttggt 240
agagagtttc tagcttagag gtagtgagca ctgtgtagat tcttggtcaa aaaggacttc 300
aacttaagac actgattact tctgtgtcga tgtataatga cacgttctat gccatcccag 360
aagaaactga tgaccccggt tccgtggtga gagtgtcaga ggagtcggtt ttgctgtggg 420
ggtagacaga taggtgac 438

```

<210> 54

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 54

```

Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
  1              5              10              15

```

```

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
      20              25              30

```

```

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
      35              40              45

```

```

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr Gly Val Pro
      50              55              60

```

```

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
      65              70              75              80

```

```

Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
      85              90              95

```

```

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100             105             110

```

<210> 55

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 55

```

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
  1              5              10              15

```

```

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
      20              25              30

```

```

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
      35              40              45

```

```

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
      50              55              60

```

```

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
      65              70              75              80

```

```

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
      85              90              95

```

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys
 100 105 110

<210> 56

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 56

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 57

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 57

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 58
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 58
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Leu Gln Thr Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 59
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 59
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser
 20 25 30
 Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Ala
 85 90 95
 Leu Gln Thr Pro
 100

<210> 60
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANT

<222> (35)..(36)

<223> XAA correspond à n'importe quel acide aminé

<220>

<221> VARIANT

<222> (39)

<223> XAA correspond à n'importe quel acide aminé

<220>

<221> VARIANT

<222> (99)

<223> XAA correspond à n'importe quel acide aminé

<400> 60

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	

Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Leu	His	Ser
			20					25					30		

Asp	Gly	Xaa	Xaa	Tyr	Leu	Xaa	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			

Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Val	Ser	Asn	Arg	Ala	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				

Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75					80

Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Met	Gln	Ala
				85					90					95	

Leu	Gln	Xaa	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
			100					105					110		

<210> 61

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Asp	Val	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly
1				5					10					15	

Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser
			20					25					30		

Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Gln	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser
		35					40					45			

Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	Val	Ser	Asn	Arg	Leu	Tyr	Gly	Val	Pro
	50					55					60				

Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile
65					70					75					80

Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly
				85					90					95	

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 62
 <211> 433
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (22)..(414)

<400> 62
 gtcagaacgc gtgccgccac c atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg 51
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu
 1 5 10

atg ttc tgg ttt cct gct tcc agc agt gat gtt gtg atg act cag tct 99
 Met Phe Trp Phe Pro Ala Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser
 15 20 25

cca ctc tcc ctg ccc gtc acc cct gga gag ccg gcc tcc atc tcc tgc 147
 Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
 30 35 40

agg tct agt cag agc att gta cat agt aat gga aac acc tat ttg caa 195
 Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln
 45 50 55

tgg tac ctg cag aag cca ggg cag tct cca cag ctc ctg atc tat aaa 243
 Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys
 60 65 70

gtt tct aat cgg ctt tat ggg gtc cct gac agg ttc agt ggc agt gga 291
 Val Ser Asn Arg Leu Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 75 80 85 90

tca ggc aca gat ttt aca ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat 339
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp
 95 100 105

gtt ggg gtt tat tac tgc ttt caa ggt tca cat gtt ccg tgg acg ttc 387
 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe
 110 115 120

ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa cgt gagtggatcc tctgcg 433
 Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 125 130

<210> 63
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 63
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Phe Pro Ala
 1 5 10 15

Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
 35 40 45

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr
 65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
 115 120 125

Glu Ile Lys
 130

<210> 64
 <211> 433
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 64
 cagtcttgcg cacggcggtg gtacttcaac ggacaatccg acaaccacga ctacaagacc 60
 aaaggacgaa ggtcgtcact acaacactac tgagtcagag gtgagagggg cgggcagtg 120
 ggacctctcg gccggaggta gaggacgtcc agatcagtcg cgtaacatgt atcattacct 180
 ttgtggataa acgttaccat ggacgtcttc ggtcccgtca gaggtgtcga ggactagata 240
 tttcaaagat tagccgaaat accccaggga ctgtccaagt caccgtcacc tagtccgtgt 300
 ctaaaatgtg acttttagtc gtctcacctc cgactcctac aaccccaa atgacgaaa 360
 gttccaagtg tacaaggcac ctgcaagccg gttccctggt tccaccttta gtttgcactc 420
 acctaggaga cgc 433

<210> 65
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Description de la séquence artificielle:
 Oligonucléotide

<400> 65
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr Gly Val Pro

50					55					60						
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	
65					70					75					80	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	
				85					90					95		
Ser	His	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	
			100					105					110			

```
<210> 66
<211> 433
<212> ADN
<213> Homo sapiens
```

```
<220>
<221> CDS
<222> (22) .. (414)
```

<400>	66															
gtcagaacgc	gtgccgccac	c	atg	aag	ttg	cct	gtt	agg	ctg	ttg	gtg	ctg		51		
			Met	Lys	Leu	Pro	Val	Arg	Leu	Leu	Val	Leu				
			1				5					10				
atg	ttc	tgg	ttt	cct	gct	tcc	agc	agt	gat	att	gtg	atg	act	cag	tct	99
Met	Phe	Trp	Phe	Pro	Ala	Ser	Ser	Ser	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	
				15					20					25		
cca	ctc	tcc	ctg	ccc	gtc	acc	cct	gga	gag	ccg	gcc	tcc	atc	tcc	tgc	147
Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly	Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	
			30					35					40			
agg	tct	agt	cag	agc	att	gta	cat	agt	aat	gga	aac	acc	tat	ttg	caa	195
Arg	Ser	Ser	Gln	Ser	Ile	Val	His	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu	Gln	
		45					50					55				
tgg	tac	ctg	cag	aag	cca	ggg	cag	tct	cca	cag	ctc	ctg	atc	tat	aaa	243
Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Lys	
	60					65					70					
gtt	tct	aat	cgg	ctt	tat	ggg	gtc	cct	gac	agg	ttc	agt	ggc	agt	gga	291
Val	Ser	Asn	Arg	Leu	Tyr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	
75					80					85					90	
tca	ggc	aca	gat	ttt	aca	ctg	aaa	atc	agc	aga	gtg	gag	gct	gag	gat	339
Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	
				95					100					105		
gtt	ggg	gtt	tat	tac	tgc	ttt	caa	ggt	tca	cat	gtt	ccg	tgg	acg	ttc	387
Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Phe	Gln	Gly	Ser	His	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	
			110					115					120			
ggc	caa	ggg	acc	aag	gtg	gaa	atc	aaa	cgt	gagtggatcc	tctgcg					433
Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys								
		125					130									

$$\begin{aligned} \langle 210 \rangle & 67 \\ \langle 211 \rangle & 131 \end{aligned}$$

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Phe Pro Ala
 1 5 10 15

Ser Ser Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30

Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
 35 40 45

Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Gln Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Gln Ser Pro Gln Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Leu Tyr
 65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val
 115 120 125

Glu Ile Lys
 130

<210> 68

<211> 433

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 68

cagtcttgcg cacggcgggtg gtacttcaac ggacaatccg acaaccacga ctacaagacc 60
 aaaggacgaa ggtcgctcact acaacactac tgagtcagag gtgagagggg cgggcagtg 120
 ggacctctcg gccggaggta gaggacgtcc agatcagttc cgtaacatgt atcattacct 180
 ttgtggataa acgttaccat ggacgtcttc ggtcccgtca gaggtgtcga ggactagata 240
 tttaaagat tagccgaaat accccaggga ctgtccaagt caccgtcacc tagtccgtgt 300
 ctaaaatgtg acttttagtc gtctcacctc cgactcctac aaccccaa atgacgaaa 360
 gttccaagt tacaaggcac ctgcaagccg gttccctggt tccaccttta gtttgcactc 420
 acctaggaga cgc 433

<210> 69

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 69

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly
 20 25 30

Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45
 Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Asp Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 70
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 70
 Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45
 Met Gly Tyr Ile Asn Tyr Asp Gly Asn Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Tyr Gly Tyr Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 71
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 71
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Ser Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Asp Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30

Tyr Trp Asn Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45
 Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Tyr Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Tyr Gly Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 72
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 72
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Ser Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Arg Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Xaa Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Leu Pro Gly Gly Tyr Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 73
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 73
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Gly

20							25					30				
Tyr	Tyr	Trp	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	
		35					40					45				
Ile	Gly	Ser	Met	Phe	His	Ser	Gly	Ser	Ser	Tyr	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	
	50					55					60					
Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	
65					70					75					80	
Leu	Gln	Leu	Arg	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	Gly	Arg	Tyr	Cys	Ser	Ser	Thr	Ser	Cys	Asn	Trp	Phe	Asp	Pro	
			100					105					110			
Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser						
		115					120									

```
<210> 74
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

```

<400> 74
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
  1              5              10              15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Gly
      20              25              30
Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
      35              40              45
Ile Gly Ser Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu
      50              55              60
Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
      65              70              75              80
Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85              90              95
Ala Arg

```

```
<210> 75
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 75
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly
20 25 30
Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp



35 40 45
 Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Asp Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 76
 <211> 445
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (22)..(426)

<400> 76

gtcagaacgc gtgocgccac c atg aaa gtg ttg agt ctg ttg tac ctc ttg 51
 Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu 10
 1 5
 aca gcc att cct ggt atc ctg tct cag gtg cag ctt cag gag tcg ggc 99
 Thr Ala Ile Pro Gly Ile Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly 25
 15 20
 cca gga ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc 147
 Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val 40
 30 35
 tct ggt tac tcc atc acc ggt ggt tat tta tgg aac tgg ata cgg cag 195
 Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln 55
 45 50
 ccc cca ggg aag gga ctg gag tgg atg ggg tat atc agc tac gac ggt 243
 Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly 70
 60 65
 acc aat aac tac aaa ccc tcc ctc aag gat cga atc acc ata tca cgt 291
 Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp Arg Ile Thr Ile Ser Arg 90
 75 80 85
 gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gct 339
 Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala 105
 95 100
 gcg gac act gca gtg tat tac tgt gcg aga tac ggt agg gtc ttc ttt 387
 Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe 120
 110 115
 gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca ggtgagtgga 436

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
125 130

tcctctgcg

445

<210> 77
<211> 135
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77
Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ile
1 5 10 15
Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
20 25 30
Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
35 40 45
Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60
Glu Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro
65 70 75 80
Ser Leu Lys Asp Arg Ile Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
85 90 95
Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
100 105 110
Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
115 120 125
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130

<210> 78
<211> 445
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 78
cagtcttgcg cacggcgggtg gtactttcac aactcagaca acatggagaa ctgtcggtaa 60
ggaccatagg acagagtcca cgtcgaagtc ctcagcccggt gtcctgacca cttcggaagc 120
ctctgggaca gggagtggac gtgacagaga ccaatgaggt agtggccacc aataaatacc 180
ttgacctatg cgtcggggg tcccttcctt gacctcacct accccatata gtcgatgctg 240
ccatgggttat tgatgtttgg gagggagttc ctagcttagt ggtatagtg actgtgcagg 300
ttcttgggtca agaggggactt cgactcgaga cactggcgac gcctgtgacg tcacataatg 360
acacgctcta tgccatccca gaagaaactg atgaccccggt tcccttggga ccagtggcag 420
aggagtccac tcacctagga gacgc 445

<210> 79
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 79

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly
 20 25 30

Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
 35 40 45

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 80

<211> 445

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (22)..(426)

<400> 80

gtcagaacgc gtgccgccac c atg aaa gtg ttg agt ctg ttg tac ctc ttg 51
 Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu
 1 5 10

aca gcc att cct ggt atc ctg tct cag gtg cag ctt cag gag tcg ggc 99
 Thr Ala Ile Pro Gly Ile Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly
 15 20 25

cca gga ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc 147
 Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val
 30 35 40

tct ggt tac tcc atc acc ggt ggt tat tta tgg aac tgg ata cgg cag 195
 Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln
 45 50 55

ccc cca ggg aag gga ctg gag tgg atc ggg tat atc agc tac gac ggt 243
 Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly
 60 65 70

acc aat aac tac aaa ccc tcc ctc aag gat cga gtc acc ata tca cgt 291
 Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp Arg Val Thr Ile Ser Arg
 75 80 85 90

gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gct 339
 Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
 95 100 105

gcg gac act gca gtg tat tac tgt gcg aga tac ggt agg gtc ttc ttt 387
 Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe
 110 115 120

gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca ggtgagtgg 436
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 125 130

tcctctgcg 445

<210> 81
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 81
 Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ile
 1 5 10 15

Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Thr
 35 40 45

Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Asp Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130

<210> 82
 <211> 445
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 82
 cagtcttgcg cacggcggtg gtactttcac aactcagaca acatggagaa ctgtcggtaa 60
 ggaccatagg acagagtcca cgtcgaagtc ctcagcccgg gtcctgacca ctccggaagc 120
 ctctgggaca gggagtggac gtgacagaga ccaatgaggt agtcgccacc aataaatacc 180
 ttgacctatg ccgtcggggg tcccttccct gacctcacct agcccatata gtcgatgctg 240
 ccatggttat tgatgttttg gagggagttc ctactcagc ggtatagtgc actgtgcagg 300
 ttcttgggtca agagggactt cgactcgaga cactggcgac gcctgtgacg tcacataatg 360

acacgctcta tgccatccca gaagaaactg atgaccccgg tcccttggga ccagtggcag 420
aggagtccac tcacctagga gacgc 445

<210> 83
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 83
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Gly Gly
20 25 30
Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45
Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu
50 55 60
Lys Asp Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80
Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 84
<211> 445
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (22)..(426)

<400> 84
gtcagaacgc gtgccgccac c atg aaa gtg ttg agt ctg ttg tac ctc ttg 51
Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu 10
aca gcc att cct ggt atc ctg tct cag gtg cag ctt cag gag tcg ggc 99
Thr Ala Ile Pro Gly Ile Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly 15 20 25
cca gga ctg gtg aag cct tcg gag acc ctg tcc ctc acc tgc act gtc 147
Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val 30 35 40
tct ggt tac tcc atc agc ggt ggt tat tta tgg aac tgg ata cgg cag 195
Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln 45 50 55

ccc cca ggg aag gga ctg gag tgg atc ggg tat atc agc tac gac ggt 243
 Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly
 60 65 70

acc aat aac tac aaa ccc tcc ctc aag gat cga gtc acc ata tca gtg 291
 Thr Asn Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys Asp Arg Val Thr Ile Ser Val
 75 80 85 90

gac acg tcc aag aac cag ttc tcc ctg aag ctg agc tct gtg acc gct 339
 Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
 95 100 105

gcg gac act gca gtg tat tac tgt gcg aga tac ggt agg gtc ttc ttt 387
 Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe
 110 115 120

gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca ggtgagtgga 436
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 125 130

tcctctgcg 445

<210> 85
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 85
 Met Lys Val Leu Ser Leu Leu Tyr Leu Leu Thr Ala Ile Pro Gly Ile
 1 5 10 15

Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
 20 25 30

Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Ser Ile Ser
 35 40 45

Gly Gly Tyr Leu Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asn Asn Tyr Lys Pro
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Asp Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 85 90 95

Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Tyr Gly Arg Val Phe Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 115 120 125

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 130

<210> 86
 <211> 445
 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 86

```
cagtcttgcg cacggcggtg gtactttcac aactcagaca acatggagaa ctgtcggtaa 60
ggaccatagg acagagtcca cgtcgaagtc ctcagcccgg gtcctgacca cttcggaagc 120
ctctgggaca gggagtggac gtgacagaga ccaatgaggt agtcgccacc aataaatacc 180
ttgacctatg ccgtcggggg tcccttccct gacctcacct agcccatata gtcgatgctg 240
ccatggttat tgatgtttgg gagggagttc ctagctcagt ggtatagtca cctgtgcagg 300
ttcttggtca agagggactt cgactcgaga cactggcgac gcctgtgacg tcacataatg 360
acacgctcta tgccatccca gaagaaactg atgaccccg tcccttggga ccagtggcag 420
aggagtccac tcacctagga gacgc
```

445

<210> 87

<211> 18

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 87

gtcagaacgc gtgccgcc

18

<210> 88

<211> 32

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 88

accatgaagt tgcctgtag gctgttggtg ct

32

<210> 89

<211> 32

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 89

gatgttctgg tttcctgctt ccagcagtga tg

32

<210> 90

<211> 32

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 90
ttgtgatgac tcagtctcca ctctccctgc cc 32

<210> 91
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 91
gtcaccctg gagagccggc ctccatctcc tg 32

<210> 92
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 92
caggtctagt cagaccatta tacatagtaa tg 32

<210> 93
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 93
gaaacaccta tttggaatgg tacctgcaga 30

<210> 94
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 94
ggcaacttca tgggtggcggc acgcgttctg ac 32

<210> 95
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle



<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 95
gaaaccagaa catcagcacc aacagcctaa ca 32

<210> 96
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 96
ctgagtcatc acaacatcac tgctggaagc ag 32

<210> 97
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 97
tctccagggg tgacgggcag ggagagtgga ga 32

<210> 98
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 98
tctgactaga cctgcaggag atggaggccg gc 32

<210> 99
<211> 31
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 99
aaataggtgt ttccattact atgtacaatg c 31

<210> 100

<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 100
cagggcagtc tccacagctc ctgatctata aa 32

<210> 101
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 101
gtttctaac ggctttatgg ggtccctgac ag 32

<210> 102
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 102
gttcagtggc agtggatcag gcacagattt ta 32

<210> 103
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 103
cactgaaaat cagcagagtg gaggctgagg at 32

<210> 104
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 104

gttggggttt attactgctt tcaaggttca ca

32

<210> 105

<211> 32

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 105

tggttcgtag acgttcggcc aagggaccaa gg

32

<210> 106

<211> 30

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 106

tggaaatcaa acgtgagtag atcctctgcg

30

<210> 107

<211> 17

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 107

tctgcaggta ccattgc

17

<210> 108

<211> 21

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 108

tgcaatggta cctgcagaag c

21

<210> 109

<211> 32

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 109

agactgccct ggcttctgca ggtaccattg ca

32

<210> 110

<211> 32

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 110

cgattagaaa ctttatagat caggagctgt gg

32

<210> 111

<211> 32

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 111

tgccactgaa cctgtcaggg accccataaa gc

32

<210> 112

<211> 32

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 112

gattttcagt gtaaaatctg tgcctgatcc ac

32

<210> 113

<211> 32

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 113

taaaccctaa catcctcagc ctccactctg ct

32

<210> 114

<211> 32



<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 114
tccacggaac atgtgaacct tgaaagcagt aa 32

<210> 115
<211> 31
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 115
tttgatttcc accttggtcc cttggccgaa c 31

<210> 116
<211> 19
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 116
cgcagaggat ccactcacg 19

<210> 117
<211> 18
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 117
gtcagaacgc gtgccgcc 18

<210> 118
<211> 34
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 118
accatgaaag tgttgagtct gttgtaccto ttga 34

<210> 119
<211> 34
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 119
cagccattcc tggatcctg tctcaggtgc agct

34

<210> 120
<211> 34
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 120
tcaggagtcg ggcccaggac tggatgaagcc ttcg

34

<210> 121
<211> 33
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 121
gagaccctgt ccctcacctg cactgtctct ggt

33

<210> 122
<211> 33
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 122
tactccatca ccggtgggta tttatggaac tgg

33

<210> 123
<211> 33
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:

Oligonucléotide

<400> 123
atacggcagc ccccagggaa gggactggag tgg 33

<210> 124
<211> 33
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 124
atgggggtata tcagctacga cggtaccaat aac 33

<210> 125
<211> 34
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 125
tcaacacttt catggtggcg gcacgcgttc tgac 34

<210> 126
<211> 34
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 126
ataccaggaa tggctgtcaa gaggtacaac agac 34

<210> 127
<211> 34
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 127
tggggcccgac tcctgaagct gcacctgaga cagg 34

<210> 128
<211> 34
<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 128

tgagggacag ggtctccgaa ggcttcacca gtcc

34

<210> 129

<211> 34

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 129

ccaccgggtga tggagtaacc agagacagtg cagg

34

<210> 130

<211> 34

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 130

ccctgggggc tgccgtatcc agttccataa'ataa

34

<210> 131

<211> 32

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 131

tagctgatat accccatcca ctccagtgccc tt

32

<210> 132

<211> 16

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 132

gttattggta ccgtcg

16



<210> 133
<211> 21
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 133
tacgacggta ccaataacta c

21

<210> 134
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 134
aaaccctccc tcaaggatcg aatcaccata tc

32

<210> 135
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 135
acgtgacacg tccaagaacc agttctccct ga

32

<210> 136
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 136
agctgagctc tgtgaccgct gcggacactg ca

32

<210> 137
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 137
gtgtattact gtgcgagata cggtagggtc tt 32

<210> 138
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 138
ctttgactac tggggccagg gaaccctggt ca 32

<210> 139
<211> 30
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 139
ccgtctctc aggtgagtgg atcctctgcg 30

<210> 140
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 140
agggagggtt tgtagttatt ggtaccgtcg ta 32

<210> 141
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 141
acgtgtcacg tgatatggtg attcgatcct tg 32

<210> 142
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle



<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 142
agagctcagc ttcagggaga actggttctt gg 32

<210> 143
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 143
cagtaataca ctgcagtgtc cgcagcggtc ac 32

<210> 144
<211> 32
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 144
agtagtcaaa gaagacccta ccgtatctcg ca 32

<210> 145
<211> 33
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 145
ctgaggagac ggtgaccagg gttccctggc ccc 33

<210> 146
<211> 18
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle:
Oligonucléotide

<400> 146
cgagaggat ccactcac 18

<210> 147
<211> 31
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 147
ctgggttactc catcagcggg gggtatttat g 31

<210> 148
<211> 31
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 148
cataaataac caccgctgat ggagtaacca g 31

<210> 149
<211> 31
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 149
gggactggag tggatcgggt atatcagcta c 31

<210> 150
<211> 31
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 150
gtagctgata taccgatcc actccagtcc c 31

<210> 151
<211> 31
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 151
tccctcaagg atcgagtcac catatcacgt g 31

<210> 152
<211> 31
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 152
cacgtgatat ggtgactcga tccttgagg g 31

<210> 153
<211> 39
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 153
gatcgagtca ccatatcagt ggacacgtcc aagaaccag 39

<210> 154
<211> 39
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 154
ctggttcttg gacgtgtcca ctgatatggt gactcgatc

39

<210> 155
<211> 31
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 155
gcttccagca gtgatattgt gatgactcag t

31

<210> 156
<211> 31
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 156
actgagtcac cacaatatca ctgctggaag c

31

ORIGINAL

CABINET REGIMBEAU
CONSEILS EN PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
20, rue de Clugny
75847 PARIS CEDEX 17 FRANCE
Tél. : 01 44 29 35 00
Fax : 01 44 29 35 99



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235*02

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° ...1/...

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 300301

Vos références pour ce dossier (facultatif)		239560 MIP	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0200654	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
NOUVELLES COMPOSITIONS A ACTIVITE ANTI-IGF-IR ET ANTI-EGFR ET LEURS APPLICATIONS.			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
PIERRE FABRE MEDICAMENT : 45, place Abel Gance 92100 BOULOGNE-BILLANCOURT - FRANCE			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		GOETSCH Liliane	
Prénoms			
Adresse	Rue	Route de Bonneville	
	Code postal et ville	74130 AYZE FR	
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		CORVAIA Nathalie	
Prénoms			
Adresse	Rue	Résidence Les Chênes	
	Code postal et ville	2 rue des Chênes 74100 St JULIEN en GENEVOIS FR	
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		LEGER Olivier	
Prénoms			
Adresse	Rue	22, rue Marc Courriard	
	Code postal et ville	74100 ANNEMASSE FR	
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)			
321169			

THIS PAGE BLANK (USPTO)